



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



KENNIA SCAPIN VIOLA

**CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO PERACÉTICO: AVALIAÇÃO METABÓLICA,
ESTRUTURAL E DE MORTE EM FIBROBLASTOS L929**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



KENNIA SCAPIN VIOLA

**CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO PERACÉTICO: AVALIAÇÃO METABÓLICA,
ESTRUTURAL E DE MORTE EM FIBROBLASTOS L929**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

Araraquara

2016

Viola, Kennia Scapin

Citotoxicidade do ácido peracético: avaliação metabólica, estrutural e de morte em fibroblastos L929 / Kennia Scapin Viola.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

58 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

1. Ácido peracético 2. Endodontia 3. Hipoclorito de sódio
4. Toxicidade 5. Fibroblastos I. Título

KENNIA SCAPIN VIOLA

**CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO PERACÉTICO: AVALIAÇÃO METABÓLICA,
ESTRUTURAL E DE MORTE EM FIBROBLASTOS L929**

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

2º Examinador: Profa. Dra Andrea Soares da Costa Fuentes

3º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho

Araraquara, 17 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

KENNIA SCAPIN VIOLA

Nascimento: 10 de novembro de 1990 - Jales – SP

Filiação: Dorivaldo Donizeth Viola
Clarice Scapin Viola

2008-2012 Curso de Graduação em Odontologia
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2011-2011 Extensão universitária em Cirurgia oral menor.
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2011-2011 Extensão universitária em Prótese dentária.
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2011-2011 Extensão universitária em Periodontia.
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2012-2012 Extensão universitária em Endodontia.
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2012-2012 Extensão universitária em Implantodontia.
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP

2013-2014 Aluna especial de Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr
UNESP- Araraquara-SP

2014-2016 Curso de Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr
UNESP/FAEPO- Araraquara-SP

2014-2016 Curso de Pós-Graduação em Endodontia - Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr
UNESP- Araraquara-SP

DEDICO ESTE TRABALHO.....

À **DEUS**, que guia minha vida. Obrigada por me proporcionar saúde, força, paciência, sabedoria, persistência e dedicação para nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada senhor pela família espetacular que tenho, pois é nela que me encontro mais perto de ti. Agradeço-te por me permitir concluir essa fase da vida, me amparando e estendendo sua mão nos momentos difíceis, pois sem **Ti** senhor este caminho seria muito mais difícil. Meu coração é muito pequeno e a alegria é muito grande, mas como tu és um Deus do pequeno, quero nessa minha pequenez dizer muito obrigada!

Aos meus pais, **Clarice e Dorivaldo** que são minha base. Obrigado por me concederem a vida nessa família exemplar. Se cheguei até aqui, não foi mérito somente meu, foi uma conquista nossa, uma conquista que foi sendo ganha aos poucos. Isso só foi possível por serem exemplo de simplicidade, honestidade e perseverança. Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida e por me acompanharem mesmo que de longe. Muitas vezes vocês presenciaram e sentiram o meu cansaço, preocupação, medos, angústias e mesmo assim me encorajavam dando forças para prosseguir. Obrigada por sempre apoiarem em minhas decisões, mesmo que seus planos fossem sacrificados para que meus objetivos fossem conquistados. Penso que nem todas as palavras que escrevi ou deixei de escrever são as ideais para descrever o quanto sou grata a vocês. Obrigada por tudo, **amo** muito vocês!

Aos meus irmãos **Bruno e Kelly** pelo companheirismo, por todo apoio e confiança que depositaram em mim. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos, pelas nossas conquistas e paciência que tivemos uns com os outros. Peço desculpas pelos momentos de impaciência, incompreensão e de algumas “briguinhas”. Tenho um orgulho imenso de vocês, desejo a vocês toda sorte do mundo e estou na torcida para que vocês conquistem seus objetivos e se tornem médicos de sucesso. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Gisele Faria**, que me recebeu como sua orientada. Agradeço por ter me proporcionado essa oportunidade de crescimento profissional desde a orientação durante a iniciação científica, despertando a cada dia mais o interesse de realizar pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos diários a cada experimento realizado. Agradeço muito pela sua paciência, por sempre estar disponível a corrigir falhas, enfim pela sua orientação como um todo. Hoje, vejo o quanto cresci como profissional e como pessoa graças a você que além de orientadora foi amiga. Tenho um privilégio e orgulho enorme de ter sua companhia durante esses anos e espero que não se limite só a isso, pois sei que há muito o que aprender com o seu vasto conhecimento. Esta pesquisa foi fruto de nossa dedicação em comum, tanto eu como você sabemos o quanto nós empenhamos para que este trabalho fosse realizado, tivemos momentos difíceis que parecia que nada daria certo, mas criamos coragem, corremos atrás e isso só foi possível porque fizemos em parceria. Ao exemplo de orientadora, minha admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga **Elisandra Márcia Rodrigues**, pelo companheirismo, amizade, compreensão, ensinamentos diários, paciência, enfim, obrigada por tudo que tem feito por mim todos esses anos. Obrigada por ajudar no laboratório de células, com seus ensinamentos que não tem fim. Obrigada por acreditar em mim, em meu potencial e por conselhos que vou levar para a vida toda. Agradeço muito a sua dedicação e colaboração nessa pesquisa, pelos dias que acordamos cedo para ir ao laboratório cuidar das nossas “filhinhas”, seja durante a semana, feirados ou mesmo nos finais de semana. Muito obrigada por ter abraçado essa pesquisa como se fosse sua. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à diretora **Prof^a.Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon** e a vice diretora **Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP-FOAr, por me darem a oportunidade de realizar a pós-graduação nesta Instituição.

Agradeço em especial o **Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho**, que me acolheu muito bem no programa de Pós-graduação em Odontologia, tanto como aluna especial como aluna da pós-graduação. Obrigada, por ter paciência, respeito e confiar em mim. Admiro o quanto é preocupado e sempre quer o melhor para os alunos da pós-graduação. Meu sincero obrigada.

Agradeço em especial o **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, por ser o principal responsável pela minha vinda para Araraquara para fazer iniciação científica. Agradeço pela sua forma de ensinar, que faz com que todos se apaixonem pelas suas aulas. Obrigada pela constante aprendizagem a cada conversa no dia-a-dia. Muito obrigada pela sua amizade.

Obrigada aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP/FOAr, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof. Dr. Renato de Toletto Leonard**, pelo convívio, respeito, ensinamentos, paciência e pela confiança que tiveram em mim.

À **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, por nos apoiar durante os experimentos e permitir o uso do laboratório para experimentos em cultura de células. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. João Santana da Silva**, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, por permitir que parte dos nossos experimentos em cultura de células fossem realizados no laboratório de Imunologia.

Aos professores **Paulo Inácio Costa e Andrea Soares da Costa Fuentes** pela colaboração e ajuda nos experimentos.

Às técnicas de laboratório **Marisa Polesi** do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, **Mônica A. de Abreu e Lígia G.V.B. Santoro** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, por darem o suporte técnico e estarem sempre dispostas a nos ajudar.

Aos amigos **Felipe, Deivys e Lucas** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pelo apoio nos experimentos, protocolos e discussão de resultados.

Aos colegas da minha turma de mestrado **Derik Damasceno Barbosa, Lauriê Garcia Belizário, Gabriela Mariana Castro Nuñez, Larissa Torres, Rodrigo Vasconcelos, Aline Silva Andrade, Fernanda Ferrari Esteves Torres, Roberto Almela Hoshino** pela força durante o decorrer do curso. Obrigado pela amizade e pelo apoio.

Aos colegas da pós-graduação, **Ana Livia Gomes Cornélio, Gisselle Moraima Chavez Andrade, Roberta Bosso, Raqueli Viapiana, Natália Kalatzis Sousa, Ariele Patrícia Rabello, Camila Galletti Espir, Camila Almeida Nascimento, Katia Keine, Letícia Boldrin Mestieri, Tiago Fonseca, Camila Lorenzenti, Wilfredo Gustavo Escalante Otárola, Bernardo Costa** pela amizade, confiança e agradável convivência.

As amigas **Miriam Grazielli Magro e Ana Carolina Venção**, que foram as primeiras pessoas da pós-graduação que tive contato e pelo apoio.

Aos meus tios que sempre se preocuparam comigo, em especial **João Donizetti Zagatti e Cleide Scapin Zagatti**, que considero como meus segundos pais. Amo muito vocês.

Aos meus primos e primas, em especial **Jenifer Scapin Zagatti e Milena Novais Costa** que sempre acompanharam mais de perto a minha jornada, dando sempre apoio e acreditando em minha capacidade.

Agradeço as minhas amigas **Mariane Herera Alcalá, Jaqueline Aguiar e Gabriela Pregnolato** pelo incentivo e apoio, mesmo estando longe.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Marinho, Wanderley, Creusa, Dona Cida, Priscila, Cida, Alessandra, Lucinha e Lindinha** pelo convívio e simpatia com que sempre me ajudaram.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier**, pelo auxílio prestado, pela disponibilidade e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

À FAPESP pela bolsa a pesquisa (Processo:2014/00723-5)

Agradeço á todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração dessa pesquisa.

*“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcuta)

Viola KS. Citotoxicidade do ácido peracético: avaliação metabólica, estrutural e de morte em fibroblastos L929 [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

A solução de ácido peracético (AP) vem sendo citada na literatura odontológica como uma possível solução irrigadora de canais radiculares. Ele apresenta a vantagem de reunir em um só produto atividade antibacteriana e capacidade de remoção de tecido orgânico e de *smear layer*. Para a seleção da solução irrigadora de canais radiculares deve-se levar em consideração não somente os seus benefícios terapêuticos, mas também os possíveis efeitos citotóxicos, uma vez que ela pode entrar em contato com os tecidos periapicais. O objetivo deste estudo foi investigar a citotoxicidade e o mecanismo de agressão celular do AP em comparação com o hipoclorito de sódio (NaOCl) sobre fibroblastos L929 por meio de avaliação metabólica, estrutural, ultraestrutural e de morte celular (necrose e/ou apoptose). As células foram incubadas com diferentes concentrações do AP a 1% e do NaOCl a 2,5%, por 10 minutos. Após este período, foram avaliados o metabolismo celular por meio do ensaio do metiltetrazólio (MTT), a morfologia externa das células em microscópio eletrônico de varredura, a ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão, o citoesqueleto por meio de marcação para actina e α -tubulina, o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados empregando ANOVA de dois fatores e pós-teste de Bonferroni ($\alpha=0.05$). Observou-se que o AP apresentou maior citotoxicidade do que o NaOCl. As alterações no metabolismo, na viabilidade, nos filamentos de actina e nos microtúbulos, na morfologia externa e na ultraestrutura das células foram observadas em concentrações menores do AP quando comparado com o NaOCl. A morte celular provocada tanto para o AP quanto para o NaOCl ocorreu predominantemente por necrose. Conclui-se que, embora apresentem o mesmo mecanismo de citotoxicidade, o AP 1% é mais citotóxico que o NaOCl a 2,5%.

Palavras-chave: Ácido peracético. Endodontia. Hipoclorito de sódio. Toxicidade. Fibroblastos.

Viola KS. Cytotoxicity of peracetic acid: metabolic, structural and death evaluation in L929 fibroblasts [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The solution peracetic acid (PA) has been reported in the dental literature as a possible root canal irrigating solution. It has the advantage of attending together in one product antibacterial activity and ability to remove of organic tissue and smear layer. For selection of root canal irrigating solution it should take into account not only its therapeutic benefits, but also the possible cytotoxic effects, since it can contact the periapical tissues. The aim of this study was to evaluate the aggression mechanism of 1% AP compared with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) on L929 fibroblasts through metabolic evaluation, structural, ultrastructural and cell death (necrosis and / or apoptosis). The cells were incubated with different dilutions of the 1% AP and 2.5% NaOCl for 10 minutes. After this period, it was evaluated the cell metabolism by methyl tetrazolium (MTT) assay, the cell external morphology in scanning electron microscope, the ultrastructure in transmission electron microscope, the cytoskeleton by marking to actin and α -tubulin, the type of cell death (necrosis or apoptosis) by flow cytometry. The results were analyzed using two-way ANOVA and Bonferroni post-test ($\alpha = 0.05$). It was observed that the AP showed higher cytotoxicity than NaOCl. Changes in metabolism, viability, in actin filaments and microtubules, surface morphology and ultrastructure cells were observed at lower dilutions AP when compared to NaOCl. Cell death caused for both the AP and for NaOCl occurred predominantly by necrosis. It was concluded, though they have the same cytotoxicity mechanism, 1% AP is more cytotoxic than the 2.5% NaOCl.

Keywords: Peracetic acid. Endodontics. Sodium hypochlorite. Toxicity. Fibroblasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	PROPOSIÇÃO.....	16
3	MATERIAL E MÉTODO.....	17
4	RESULTADO.....	22
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Embora vários fatores possam contribuir para falhas da terapia endodôntica, a persistência da infecção intra-radicular é a principal causa de insucessos (Siqueira¹¹⁷, 2001; Ricucci et al.^{103,104}, 2015; 2016). Desse modo, os principais objetivos do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar são a redução ou eliminação da infecção microbiana do sistema de canais radiculares (Evans et al.²⁸, 2003; Wuerch et al.¹³⁰, 2004; Kanisavaran⁶⁷, 2008; Kawashima et al.⁶⁸, 2009; Mohammadi, Abbott⁸³, 2009; Pladisai et al.⁹⁹, 2016; van der Meer et al.¹²³, 2016).

O controle da infecção endodôntica é realizado por meio de vários procedimentos combinados (Haapasalo et al.⁵¹, 2000). A instrumentação, irrigação e medicação intracanal reduzem significativamente a microbiota do sistema de canais radiculares (Byström, Sundqvist¹¹, 1985; Faria et al.³³, 2005). No entanto, estes procedimentos não eliminam completamente os micro-organismos de áreas de difícil acesso, como túbulos dentinários, canais laterais e ramificações apicais (Nair et al.⁸⁸, 2005; Harrison et al.⁵⁴, 2010; Ricucci¹⁰² et al., 2010). Assim, devem ser pesquisadas novas soluções irrigadoras e medicamentos visando à obtenção de maiores índices de sucesso do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o agente irrigante mais comumente utilizado, principalmente devido a sua atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual (Zehnder¹³³, 2006; Mohammadi⁸², 2008; Haapasalo et al.⁵², 2014; del Carpio-Perochena et al.²³, 2015), sendo considerado o irrigante endodôntico “padrão ouro” (Zehnder¹³³, 2006; Garcia et al.⁴², 2010).

Entretanto, o NaOCl não promove remoção da *smear layer* da superfície dentinária (Violich e Chandler¹²⁵, 2010; Gaddala et al.⁴¹, 2015). Além disso, altera negativamente algumas propriedades mecânicas da dentina e pode reduzir a resistência de união dos cimentos endodônticos e de alguns materiais à dentina (Pascon et al.⁹⁶, 2009; Martinho et al.⁸⁰, 2015; Neelakantan et al.⁹⁰, 2015). O NaOCl a 2,5% é recomendado por diversos autores em casos de necrose pulpar e lesão periapical ou casos de retratamento endodôntico (Siqueira et al.¹¹⁶, 1997; Pladisai et al.⁹⁹, 2016). Concentrações mais elevadas são mais irritantes aos tecidos vivos apicais e periapicais (Zehnder et al.¹³², 2002; Gernhardt et al.⁴³, 2004; Mohammadi⁸², 2008; de Sermeño et al.²⁴, 2009). A procura por uma solução irrigadora alternativa ao NaOCl é focada em substâncias que possuem efeito antimicrobiano, capacidade de dissolução de tecido orgânico (Zehnder¹³³, 2006; Haapasalo et al.⁵², 2014; del Carpio-Perochena et al.²³, 2015) e

remocção da *smear layer* (Lottanti et al.⁷⁵, 2009; Gaddala et al.⁴¹, 2015) e que sejam biocompatíveis (Gomes-Filho et al.⁴⁵, 2008; Bajrami et al.⁴, 2014).

O ácido peracético (AP), que é um agente oxidante forte (Kitis et al.⁷⁰, 2004; Finnegan et al.³⁷, 2010) e desinfetante (Kitis et al.⁷⁰, 2004), vem sendo citado na literatura odontológica como uma possível solução irrigadora de canais radiculares. Ele apresenta a vantagem de reunir em um só produto atividade antibacteriana (Guerreiro-Tanomaru et al.⁴⁹, 2011; Dornelles-Morgental et al.²⁶, 2011; Ordinola-Zapata et al.⁹², 2013) e capacidade de remoção da *smear layer* (Lottanti et al.⁷⁵, 2009; De-Deus et al.²², 2011).

O AP é amplamente utilizado para esterilização ou desinfecção de equipamentos médicos (Kovaleva et al.⁷¹, 2010; Ryu et al.¹⁰⁸, 2013) e dentários termo sensíveis (Ceretta et al.¹³, 2008; Carvalho et al.¹², 2015), para a desinfecção de linhas d'água de unidades auxiliares odontológicas (Montebugnoli et al.⁸⁵, 2004), de alimentos (Nascimento et al.⁸⁹, 2003; Walter et al.¹²⁷, 2009; Kerkaert et al.⁶⁹, 2011; Dai et al.²¹, 2012), de água em companhias de tratamento de água e esgoto, entre outros (Kitis et al.⁷⁰, 2004; Chassot et al.²⁰, 2006; Rossi et al.¹⁰¹, 2007; Mattle et al.⁸¹, 2011). Ele tem ação rápida e é efetivo contra bactérias, fungos, esporos e vírus (Gaddala et al.⁴¹, 2015), em concentrações menores que 0,5% (Baldry⁵, 1983; Lensing, Oei⁷⁴, 1985; Chassot et al.²⁰, 2006; Costa et al.¹⁷, 2015; Lee et al.⁷³, 2016). Ao contrário a maioria dos desinfetantes químicos, os desinfetantes a base de AP não são inativados na presença de matéria orgânica (British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee¹⁰, 1998; Chassot et al.²⁰, 2006).

O AP é comercialmente disponível na forma de solução aquosa, onde está em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio e ácido acético e quando utilizado se decompõe em subprodutos seguros: água, ácido acético e oxigênio (Martell, Motekaitis⁷⁹, 1992; British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee¹⁰, 1998). O ácido acético presente nessa solução é o provável responsável pela dissolução da camada de *smear layer* (De-Deus et al.²², 2011; Lottanti et al.⁷⁵, 2009).

Embora o mecanismo de ação antimicrobiana do AP não esteja completamente esclarecido, acredita-se que ele desnatura proteínas de maneira semelhante ao peróxido de hidrogênio, aumentando a permeabilidade da membrana celular e inativando enzimas essenciais ao metabolismo celular (Kitis et al.⁷⁰, 2004; Fraser et al.³⁹, 1984; Rutala, Weber¹⁰⁷, 1998; Griffiths et al.⁴⁸, 1999). Devido a sua biodegradabilidade, os fabricantes normalmente afirmam que AP é minimamente tóxico e não corrosivo, na concentração utilizada para a desinfecção (Loukili et al.⁷⁶, 2004).

Em Odontologia, o AP tem sido estudado em diferentes concentrações de uso: 1 a 10% para a dissolução de tecido necrótico (Naenni et al.⁸⁶, 2004; Tanomaru-Filho et al.¹²¹, 2015), 0,2% e 2% para descontaminação de resina acrílica (Chassot et al.²⁰, 2006; Fernandes et al.³⁶, 2013; Panariello et al.⁹⁴, 2015) e de resina composta indireta (Samuel et al.¹¹¹, 2011), 1 ou 2% para descontaminação de cones de guta-percha e de Resilon (Salvia et al.¹¹⁰, 2011; Subha et al.¹¹⁹, 2013) 1% para a remoção de medicação intracanal de hidróxido de cálcio (Sagsen et al.¹⁰⁹, 2012) e 0,5 a 4% para irrigação de canais radiculares, seja como agente para a desinfecção ou para a remoção de *smear layer* (Lottanti et al.⁷⁵, 2009; Kuga et al.⁷², 2011; Dornelles-Morgental et al.²⁶, 2011, De-Deus et al.²², 2011; Guerreiro-Tanomaru et al.⁴⁹, 2011; Ordinola-Zapata et al.⁹², 2013; Nagas et al.⁸⁷, 2014).

Ainda não foi determinada na literatura a concentração ideal do AP para uso em Endodontia. Para remoção de *smear layer*, o AP a 0,5% e a 2,25% apresentaram eficácia semelhante a do EDTA a 17% (Lottanti et al.⁷⁵, 2009; De-Deus et al.²², 2011).

Quando empregado com finalidade antibacteriana, o AP a 1% necessitou de um maior tempo de contato com *Enterococcus faecalis* do que o NaOCl a 2,5% e a clorexidina a 2%, para exercer sua atividade avaliada pelo teste de contato direto. Tanto o NaOCl a 2,5%, quanto a clorexidina a 2% eliminaram completamente o *E. faecalis* depois de 30 segundos de contato. Já o AP a 1% levou a redução da contagem bacteriana em 86% em 3 minutos e eliminação de *E. faecalis* após 10 minutos. (Guerreiro-Tanomaru et al.⁴⁹, 2011). No entanto, quando empregado como solução irrigadora durante a instrumentação de canais radiculares de dentes humanos extraídos contaminados com *E. faecalis*, o AP a 1% apresentou eficácia antibacteriana semelhante ao NaOCl a 2,5% e a clorexidina a 2% (Dornelles-Morgental et al.²⁶, 2011). Ordinola-Zapata et al.⁹² (2013) avaliaram o efeito do MTAD, Qmix, Smear Clear, ácido maleico a 7%, iodeto de potássio com iodo a 2%, NaOCl a 2,5% e 5,25% e AP a 4% sobre a arquitetura e viabilidade de biofilme misto formado sobre blocos de dentina. Verificaram que apenas as soluções de NaOCl e de AP a 4% reduziram o número de bactérias viáveis e dissolveram o biofilme de forma estatisticamente significativa.

Para a seleção da solução irrigadora de canais radiculares deve-se levar em consideração não somente os seus benefícios terapêuticos, mas também os possíveis efeitos citotóxicos (Yasuda et al.¹³¹, 2010) uma vez que ela pode entrar em contato com os tecidos periapicais (Yasuda et al.¹³¹, 2010; Bajrami et al.⁴, 2014).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar a citotoxicidade e o mecanismo de agressão celular do AP em comparação com o NaOCl sobre fibroblastos L929 por meio de avaliação metabólica, estrutural, ultraestrutural e de morte celular (necrose e/ou apoptose).

3 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia foi subdividida nas etapas abaixo.

Preparo das soluções irrigadoras

No presente estudo foram estudadas as soluções de NaOCl a 2,5% e de AP a 1%. A solução de estoque de NaOCl a 2,5% (Asfer, São Caetano do Sul, SP, Brasil) foi titulada pelo método físico-químico de espectrofotometria para determinar o teor de cloro disponível (American Public Health Association², 2012). A solução AP a 1% foi preparada imediatamente antes do uso a partir da diluição do AP (Peroxyacetic acid- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em água deionizada. O AP (Peroxyacetic acid - Sigma) é composto por ácido peracético a 36 - 40% e peróxido de hidrogênio a 5 - 8%. As soluções de AP a 1% e de NaOCl a 2,5 % foram consideradas como grau de diluição “1” (Ryu et al.¹⁰⁸, 2013) e foram submetidas a diluições seriadas em soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%) empregando fator de diluição de 1,5. As células foram incubadas com as soluções nas diluições de 1/250, 1/375, 1/562, 1/844, 1/1266, 1/898, 1/2848, 1/4271 e 1/6407, correspondentes respectivamente as concentrações de 0,4%, 0,26%, 0,18%, 0,12%, 0,08%, 0,05%, 0,03%, 0,02% e 0,015%.

Cultura de fibroblastos L929

Os fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram cultivados em garrafas, com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Invitrocell, Campinas, SP, Brasil), penicilina (100 U/m) e estreptomicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Para a realização dos experimentos, os fibroblastos foram destacados das garrafas com tripsina, o sobrenadante foi centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos a 5°C, o pellet foi ressuspensionado em DMEM com SFB 10% e as células foram contadas em hemocitômetro (Reichert, Buffalo, NY). Os fibroblastos foram cultivados em placas de cultura de 24 ou 96 poços (Corning, NY, EUA), ou em lâminas Lab-Tek (Nalge Nunc, Naperville, IL, EUA) contendo DMEM com SFB 10% e foram mantidos na estufa por 24 horas para aderirem nas placas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com diferentes concentrações do AP e do NaOCl, com soro fisiológico (controle) ou com DMEM com SFB a 10% (controle adicional), por um período de 10 minutos. As drogas e controles foram então removidos, e as células foram

incubadas com DMEM com SFB a 10% durante 4 horas (Giannelli et al., 2008), para em seguida serem submetidas aos ensaios descritos abaixo.

Avaliação da viabilidade/metabolismo celular por ensaio de MTT

Os fibroblastos foram cultivados em placa de 96 poços numa concentração de 1×10^5 células/mL. Após a realização do protocolo de tratamento das células com os irrigantes nas concentrações de 0,015 a 0,4%, o meio de cultura foi removido, e foi adicionado 100µl da solução de MTT (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 0,5mg/mL, sendo as células incubadas por 3 horas em estufa 5% de CO₂, 95% de umidade à 37°C. Após este período, foram adicionados 100µL álcool isopropílico acidificado (HCl: álcool isopropílico, 0.04N) ao extrato para solubilizar os cristais de formazan. As densidades ópticas das soluções foram medidas por espectrofotômetro com filtros de 540 e 620nm de comprimento de onda (ThermoPlate, Nanshan District, Shenzhen, China). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada comparando a absorbância de cada concentração do AP e do NaOCl com o controle do soro fisiológico. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em três momentos distintos.

Análise do citoesqueleto - fluorescência para actina e α -tubulina

Os fibroblastos foram cultivados em lâminas Lab-Tek™ (Nalge Nunc Int., Rochester, New York, USA) na concentração de 1×10^5 células/mL e incubados com as soluções de AP e de NaOCl nas concentrações de 0,02 a 0,26% e com os controles. Para o ensaio de marcação fluorescente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4%, por 20 minutos e lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos e as ligações não específicas foram bloqueadas com BSA/PBS a 1%. As células foram, então, incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário para marcação dos microtúbulos (monoclonal mouse anti- α - tubulin; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA; 1:200). Depois de lavar 3 vezes com PBS por 30 minutos, as células foram incubadas com o anticorpo secundário FITC-conjugated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame; 1:200) por 1 h a 37 °C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos, e depois os filamentos de actina foram marcados pela incubação das células com actina (Alexa Fluor® 594 Phalloidin - Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) diluída em BSA 1%, 1:100, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram novamente lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos. Para coloração do DNA, as células foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma)

300 nM, por 3 minutos, a 37°C. As lâminas foram montadas com Prolong (Invitrogen Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EUA). As células foram analisadas e fotografadas utilizando o microscópio Leica DM 6000M (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipado com o Sistema de deconvolução (Leica Microsystems) Leica AF6000 (Leica Microsystems). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Análise da mortalidade celular por citometria de fluxo

A avaliação da presença de necrose e apoptose foi efetuada por citometria de fluxo empregando-se anexina V-FITC e iodeto de propídeo - PI (Annexin V-FITC Kit; Abcam, Cambridge, Inglaterra). A anexina V conjugada com a fluoresceína é usada para quantificação de células apoptóticas por se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática carregados negativamente como a fosfatidilserina. Nos estágios iniciais de apoptose, a molécula de fosfatidilserina transloca da camada interna para a externa da membrana plasmática. Uma vez que as células necróticas também expõem a fosfatidilserina devido à perda de integridade da membrana, foi empregado o PI para diferenciar as células necróticas das apoptóticas. O PI é um corante vital frequentemente usado para identificar células necróticas, com base na perda de integridade da membrana. As células apoptóticas mantêm a integridade da membrana plasmática durante a maior parte do processo de apoptose e se torna permeável ao PI durante a necrose secundária (Vermes et al.¹²⁴, 1995).

Foram cultivadas 1×10^6 células/mL L929 em placas de 24 poços, que foram incubadas com as soluções de AP e de NaOCl nas concentrações de 0,015 a 0,4% e com os controles. Como controle positivo da reação foi empregado o peróxido de hidrogênio (1mM). Os fibroblastos foram destacados da placa utilizando *scraper*, coletados e lavados duas vezes em PBS a 4° C. Uma quantidade de 1×10^6 células foram incubadas em 100µL de solução tampão contendo anexina V-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) por 15 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e, em seguida, marcadas com iodeto de propídeo (PI) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). As amostras foram analisadas em separador celular ativado por fluorescência (FACS) (Beckton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Pelo menos 1×10^5 células por amostra foram adquiridas e foram avaliadas populações específicas, individualizadas por *gates* com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). As porcentagens de células viáveis (anexina V-; PI-), células apoptóticas (anexina V+) e células necróticas (anexina V-; PI+ e anexina V+; PI+) foram determinadas como descrito previamente (Vermes et al.¹²⁴, 1995). Os ensaios foram realizados em triplicata

e repetidos em três momentos distintos. Os dados foram expressos como porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas.

Análise da morfologia externa das células por microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Os fibroblastos foram cultivados sobre lamínulas esterilizadas, de 13 mm de diâmetro, colocadas em placas de cultura de 24 poços, numa concentração de 5×10^4 células/mL e incubados com as soluções de AP e de NaOCl nas concentrações de 0,015 a 0,4% e com os controles. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M e fixadas em aldeído glutárico a 4%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,4, por 20 minutos, a 37°C. O material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 3 vezes e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, por uma hora. Após novas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M (3 vezes de 15 minutos), as células foram desidratadas em série crescente de álcool (50%, 70% e 95%, 10 minutos cada e 100%, 2 trocas de 20 minutos cada). O material foi seco pelo método do ponto crítico com dióxido de carbono (CO₂) em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as lamínulas foram fixadas em *stubs* com cola de prata (Provac AG, Balzers, Liechtenstein) e, foi realizada a metalização com ouro-paládio sob vácuo em equipamento Emitech K 650 (Emitech Ltda, Ashford, Kent, Inglaterra). O material foi observado em MEV (EVO 50, Zeiss, Cambrige, UK) a 15 kV, com aumento de 3000X, acoplado com sistema computadorizado de captura de imagens.

Análise da ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão

Foram cultivadas 5×10^5 células/mL em placas de 24 poços. Após a realização do protocolo de tratamento com os irrigantes nas concentrações de 0,05, 0,08 e 0,12% e com os controles, as células foram retiradas das placas com *scraper* (Corning) e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas em aldeído glutárico a 1,4% com sacarose 0,2M, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2M, por 30 minutos, a 37°C. O material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, por 1 hora, a 4°C. Após lavagem em tampão cacodilado de sódio 0,1M, as células foram mantidas na solução de acetato de uranila a 0,5% com sacarose, a 4°C, por 12 horas (contrastação em bloco). Em seguida, realizou-se os seguintes procedimentos: desidratação das células em série crescente de acetona nas concentrações de 30, 50, 70, 90 e 95% (10 minutos cada) e 100% (3 trocas de 20 minutos). Infiltração da mistura de resina e acetona nas proporções de 3:1, 1:1 e

1:3 (1 hora cada), resina pura (3 trocas de 1 hora cada) e inclusão em resina Araldite 502 (Polysciences Inc., Washington, PA, EUA). Foram obtidos cortes de 0,75µm com navalha de vidro, corados com azul de toluidina e examinados em microscópio óptico para a seleção das áreas posteriormente submetidas a cortes ultrafinos. Cortes de 20 a 40nm obtidos por meio de navalha de diamante em ultramicrotomo digital Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) foram colocados em grades de cobre de 200 mesh (Polysciences Inc.) e duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo por 30 minutos. O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM- 100 CXII, Peabody, Massachusetts, USA) equipado com câmera digital a 80 kV.

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados empregando ANOVA de dois fatores e pós-teste de Bonferroni ($\alpha = 0.05$), por meio do programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

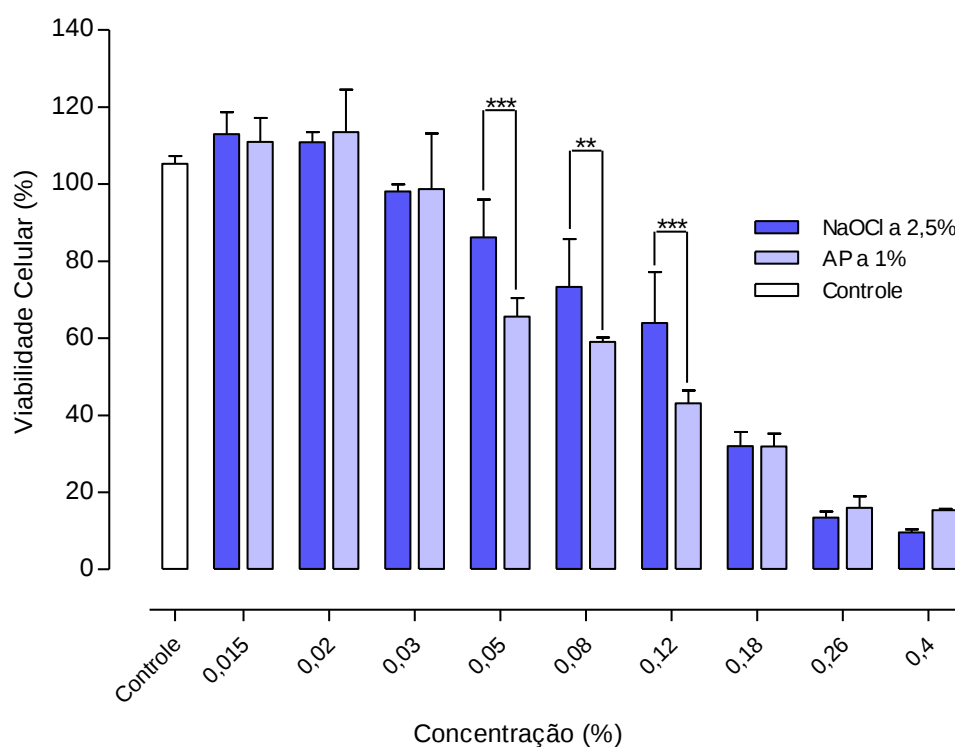
4 RESULTADO

Os resultados abaixo foram subdivididos quanto a citotoxicidade das soluções irrigadoras (NaOCl e AP) sobre as células de linhagem L929 pelo ensaio de MTT, análise do citoesqueleto, análise do tipo de morte celular (necrose e/ou apoptose), microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

Viabilidade/metabolismo celular por ensaio de MTT

Verificamos que as concentrações de 0,015 a 0,4% de AP e de NaOCl foram adequadas para avaliar a dose-resposta pois nas menores concentrações (maiores diluições) havia uma viabilidade celular de aproximadamente 100% e conforme aumentou a concentração, essa viabilidade diminuiu gradualmente até chegar próximo a zero. As soluções de NaOCl a 2,5% e de AP a 1% apresentaram efeito no metabolismo celular de maneira dose-dependente; quanto maior a concentração maior a citotoxicidade. Observou-se que o AP a 1% apresentou maior citotoxicidade do que o NaOCl a 2,5% nas concentrações de 0,05, 0,08 e 0,12% (Figura 1). Assim, conclui-se que o AP a 1% é mais citotóxico do que o NaOCl, apresentando menor viabilidade celular.

Figura 1 - Ensaio do MTT. Viabilidade das células L929 após exposição ao ácido peracético (AP) e ao hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes concentrações. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.



Fonte: Elaboração própria

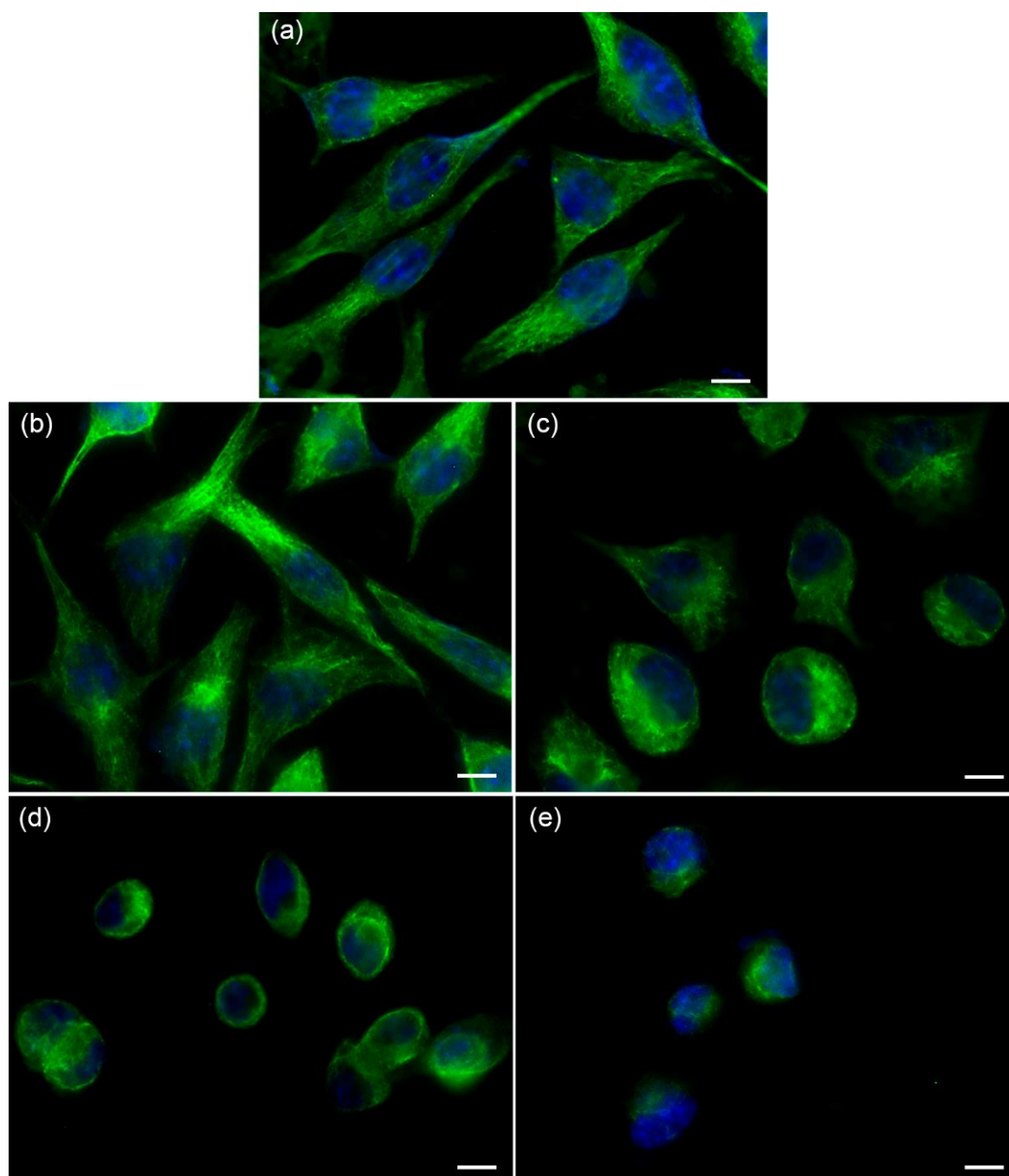
Análise do citoesqueleto - fluorescência para actina e α -tubulina

Nas células expostas ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), os microtúbulos (α -tubulina) e os filamentos de actina apresentavam-se distribuídos uniformemente em volta do núcleo, ocupando todo o volume citoplasmático.

No grupo do NaOCl, as células expostas às concentrações de 0,02%, 0,03% e 0,05% apresentavam os dois componentes do citoesqueleto semelhantes aos grupos controles. As células expostas ao NaOCl a 0,08% apresentavam filamentos mais grosseiros de actina, alterações nos microtúbulos e perda do formato estrelado. Nas células incubadas com o NaOCl a 0,12%, os microtúbulos e os filamentos de actina apresentavam-se desorganizados e dispostos em volta do núcleo; o formato alongado das células foi perdido, e a maioria apresentava aparência arredondada. O NaOCl a 0,18% e a 0,26% levou ao colapso dos componentes do citoesqueleto avaliados (Figuras 2 e 4).

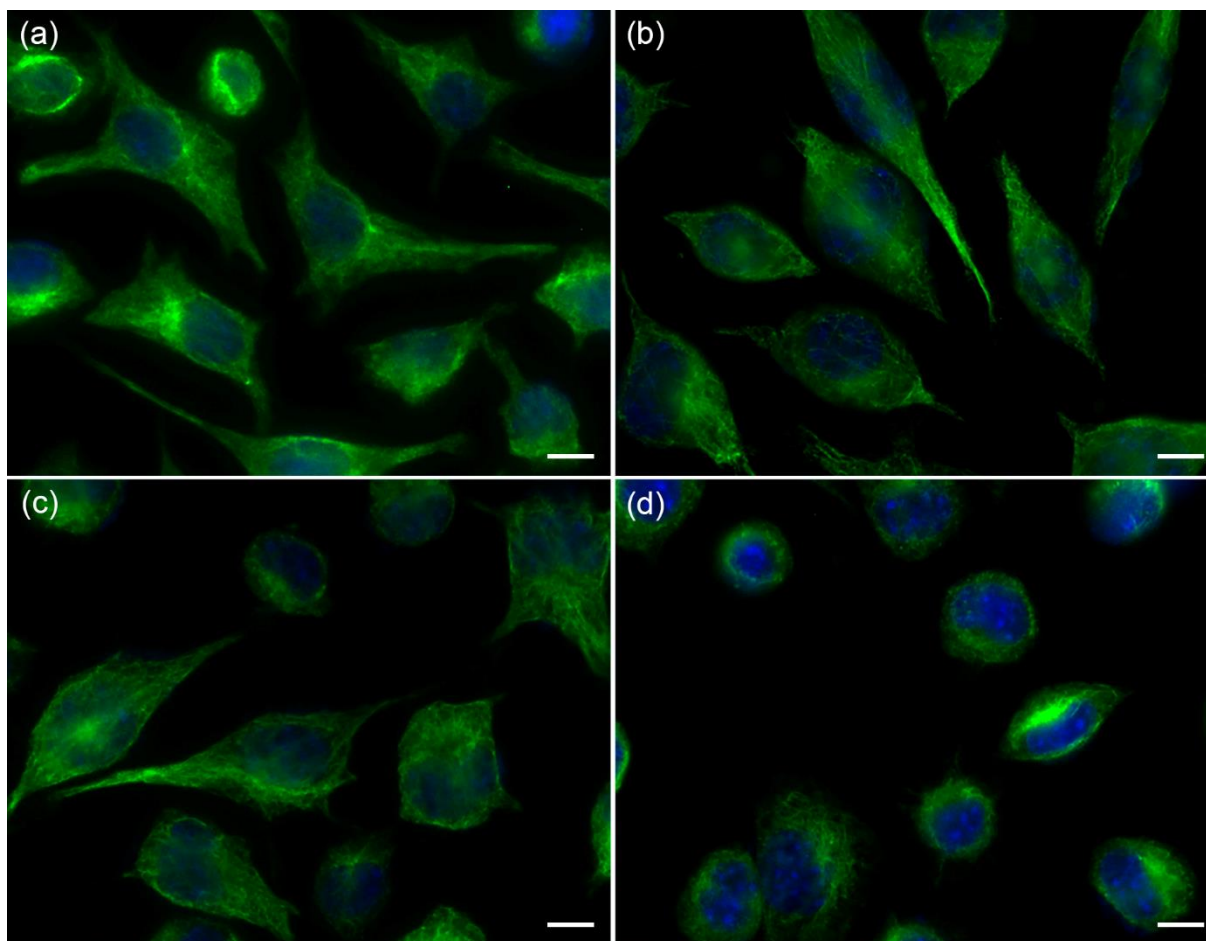
As células expostas ao AP nas concentrações de 0,02% e de 0,03% apresentavam os dois componentes do citoesqueleto semelhantes aos grupos controles. Na concentração de 0,05% os microtúbulos e os filamentos de actina colabados, o formato alongado das células foi perdido e a maioria apresentava aparência oval ou arredondada. A partir da concentração de 0,08% houve colapso dos componentes do citoesqueleto avaliados impedindo a fluorescência necessária para a captação das imagens (Figuras 3 e 5). Em resumo as alterações no citoesqueleto foram detectadas no grupo do NaOCl a partir da concentração de 0,08% e no grupo do AP a partir da concentração de 0,05%.

Figura 2 - Imunomarcação para α -tubulina em fibroblastos L929 expostos ao hipoclorito de sódio (NaOCl). Os microtúbulos foram marcados com anti- α -tubulina (fluorescência verde) e o núcleo marcado com DAPI (fluorescência azul). (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam os microtúbulos formando uma densa rede distribuída em volta do núcleo, ocupando todo o espaço citoplasmático. (b) Nas concentrações de 0,02%, 0,03% e 0,05% as células apresentavam os microtúbulos semelhantes ao grupo controle. (c) Nos fibroblastos expostos ao NaOCl a 0,08%, os microtúbulos apresentavam-se mais grosseiros e as células haviam perdido o formato estrelado. (d) Os fibroblastos expostos ao NaOCl a 0,12% apresentavam microtúbulos desorganizados e dispostos em volta do núcleo e as células apresentavam-se arredondadas. (e) O NaOCl nas concentrações de 0,18 e 0,26% levou ao colapso dos microtúbulos. Barra = 50 μ m.



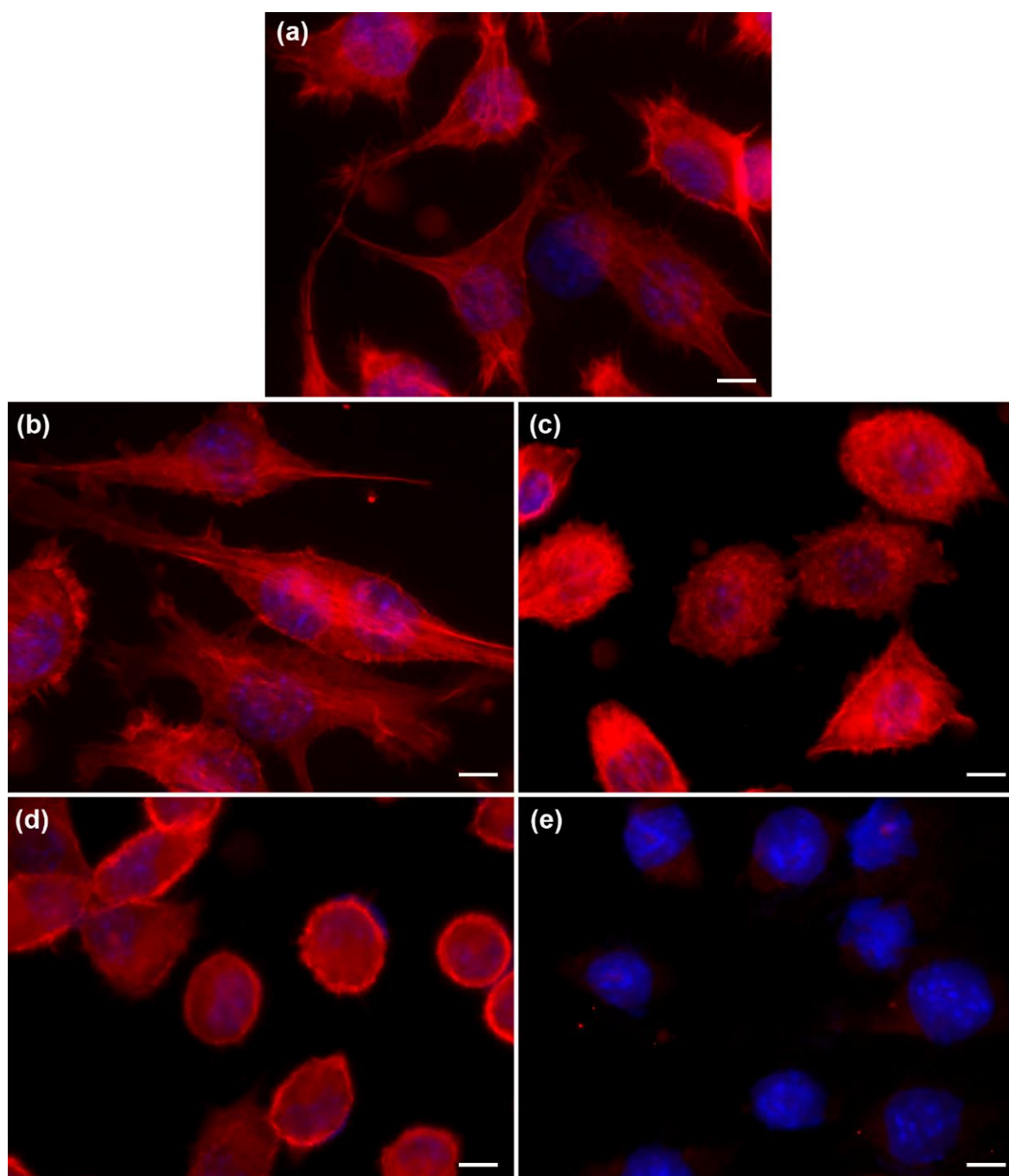
Fonte: Elaboração própria

Figura 3 - Imunomarcacão para α -tubulina em fibroblastos L929 expostos ao ácido peracético (AP). Os microtúbulos foram marcados com anti- α -tubulina (fluorescência verde) e o núcleo marcado com DAPI (fluorescência azul). (a) Os fibroblastos expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam os microtúbulos formando uma densa rede distribuída em volta do núcleo, ocupando todo o espaço citoplasmático. (b, c) Nas concentrações de 0,02% e de 0,03%, as células apresentavam os microtúbulos semelhantes ao grupo controle. (d) Nos fibroblastos expostos ao AP a 0,05%, os microtúbulos apresentavam-se colabados e as células haviam perdido o formato estrelado. Barra = 50 μ m.



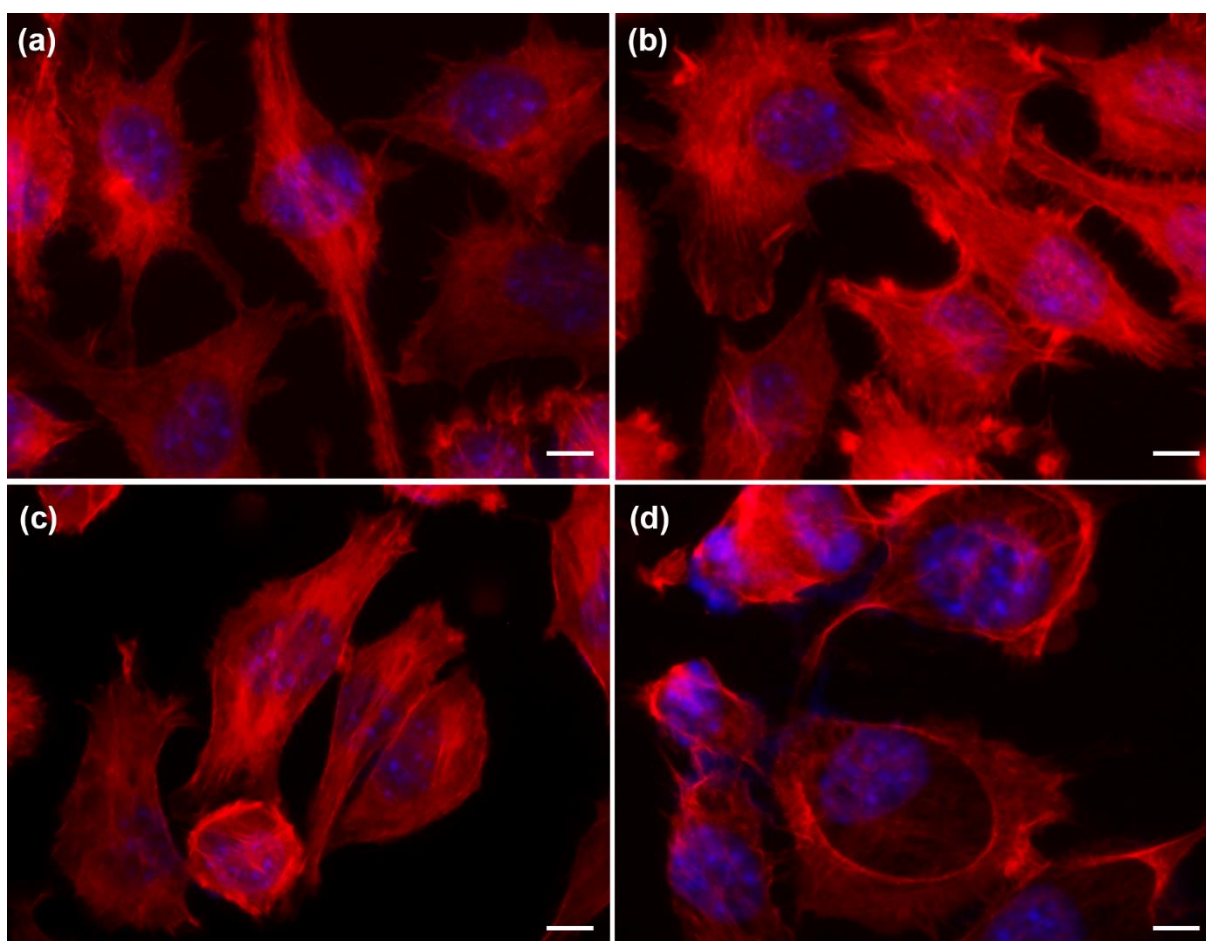
Fonte: Elaboração própria

Figura 4 - Fluorescência para actina em fibroblastos L929 expostos ao hipoclorito de sódio (NaOCl). A actina apresenta fluorescência vermelha e o núcleo fluorescência azul. (a) Os fibroblastos expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam os filamentos de actina, bem organizados, distribuídos em volta do núcleo, ocupando todo o espaço citoplasmático. (b) Nas concentrações de 0,02%, 0,03% e 0,05%, as células apresentavam os filamentos de actina semelhantes ao grupo controle. (c) Nos fibroblastos expostos ao NaOCl a 0,08%, os filamentos de actina apresentavam-se mais grosseiros e as células haviam perdido o formato estrelado. (d) Os fibroblastos incubados com o NaOCl a 0,12% apresentavam filamentos de actina desorganizados e dispostos em volta do núcleo e as células apresentavam arredondadas. (e) O NaOCl nas concentrações de 0,18 e 0,26% levou ao colapso dos filamentos de actina. Barra = 50µm.



Fonte: Elaboração própria

Figura 5 – Fluorescência para actina em fibroblastos L929 expostos ao ácido peracético (AP). A actina apresenta fluorescência vermelha e o núcleo fluorescência azul. (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam os filamentos de actina, bem organizados, distribuídos em volta do núcleo, ocupando todo o espaço citoplasmático. (b, c) Nas concentrações de 0,02% e de 0,03%, as células apresentavam os filamentos de actina semelhantes ao grupo controle. (d) Nos fibroblastos expostos ao AP a 0,05% os filamentos de actina apresentavam-se colabados e as células haviam perdido o formato estrelado. Barra = 50µm.

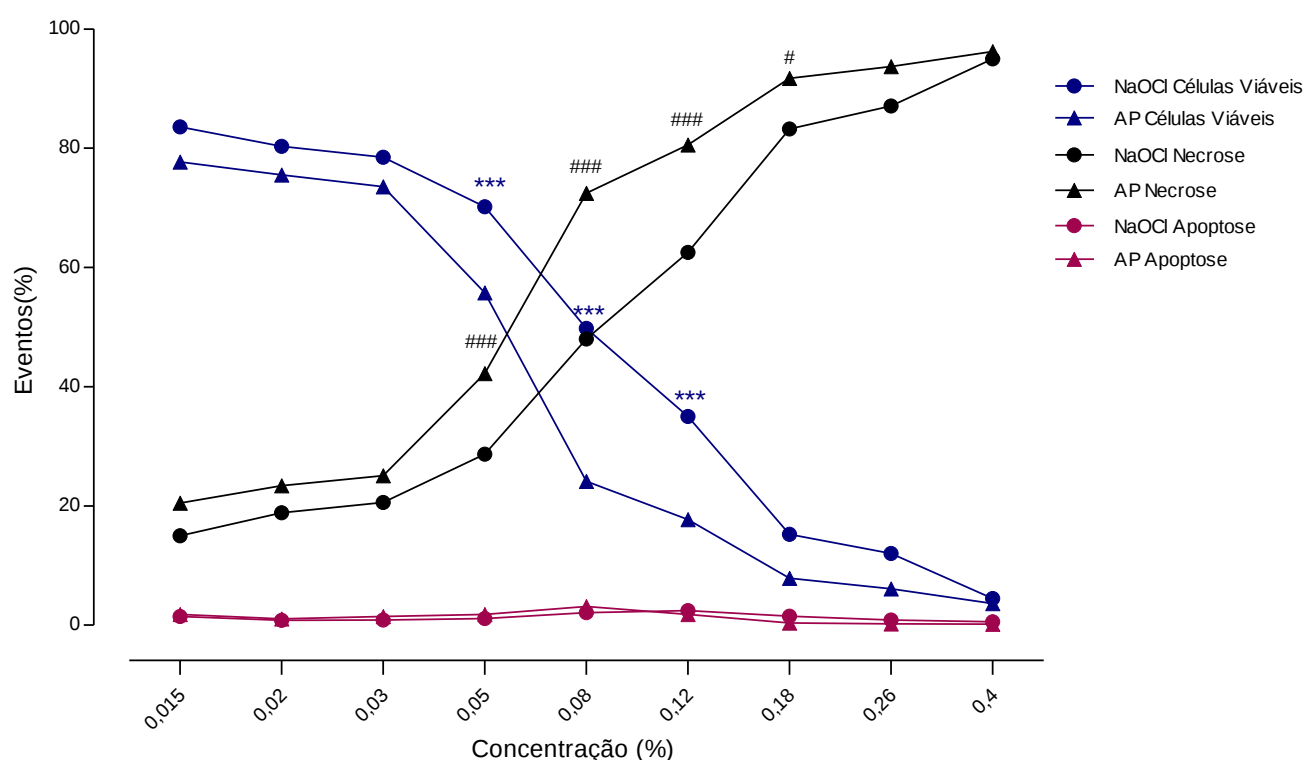


Fonte: Elaboração própria

Mortalidade celular

A Figura 6 mostra a porcentagem de células L929 viáveis, necróticas e apoptóticas expostas ao AP e ao NaOCl. Houve menor porcentagem de viabilidade e maior porcentagem de necrose das células expostas ao AP do que as células expostas ao NaOCl. A morte celular tanto para o AP quanto para o NaOCl ocorreu predominantemente por necrose. Houve baixa porcentagem de morte por apoptose para ambos os irrigantes.

Figura 6 - Avaliação por citometria de fluxo da viabilidade e mortalidade por apoptose ou necrose de fibroblastos L929 em cultura, após a exposição a diferentes concentrações de ácido peracético (AP) e de hipoclorito de sódio (NaOCl). *** $p < 0,001$ representa os resultados das comparações dos grupos do NaOCl e do AP nas mesmas concentrações, para a porcentagem de células viáveis e ### $p < 0,001$; # $p < 0,05$ para a porcentagem de eventos de necrose. Não houve diferença entre os grupos para os eventos de apoptose.

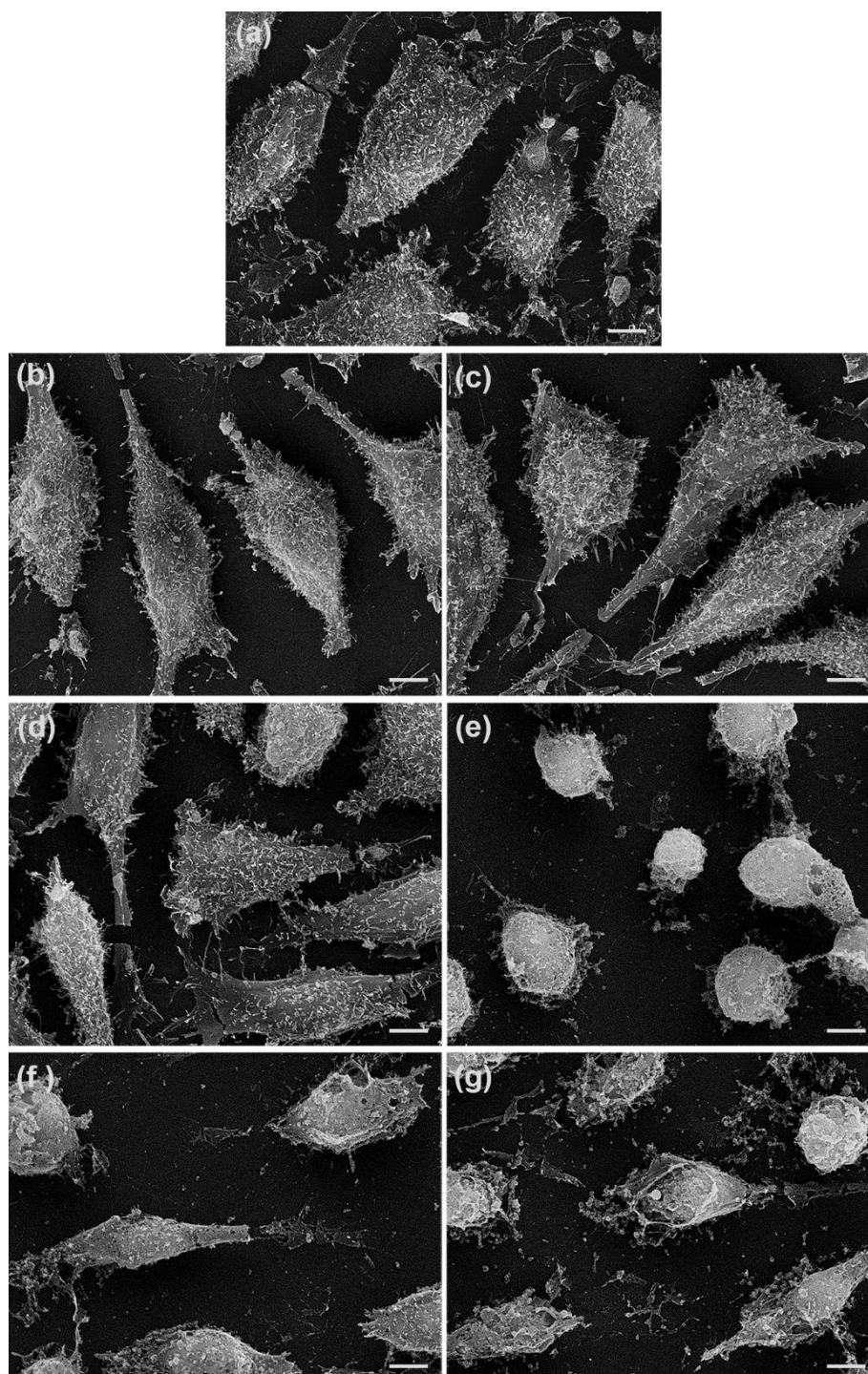


Fonte: Elaboração própria

Análise da morfologia externa das células por microscópio eletrônico de varredura

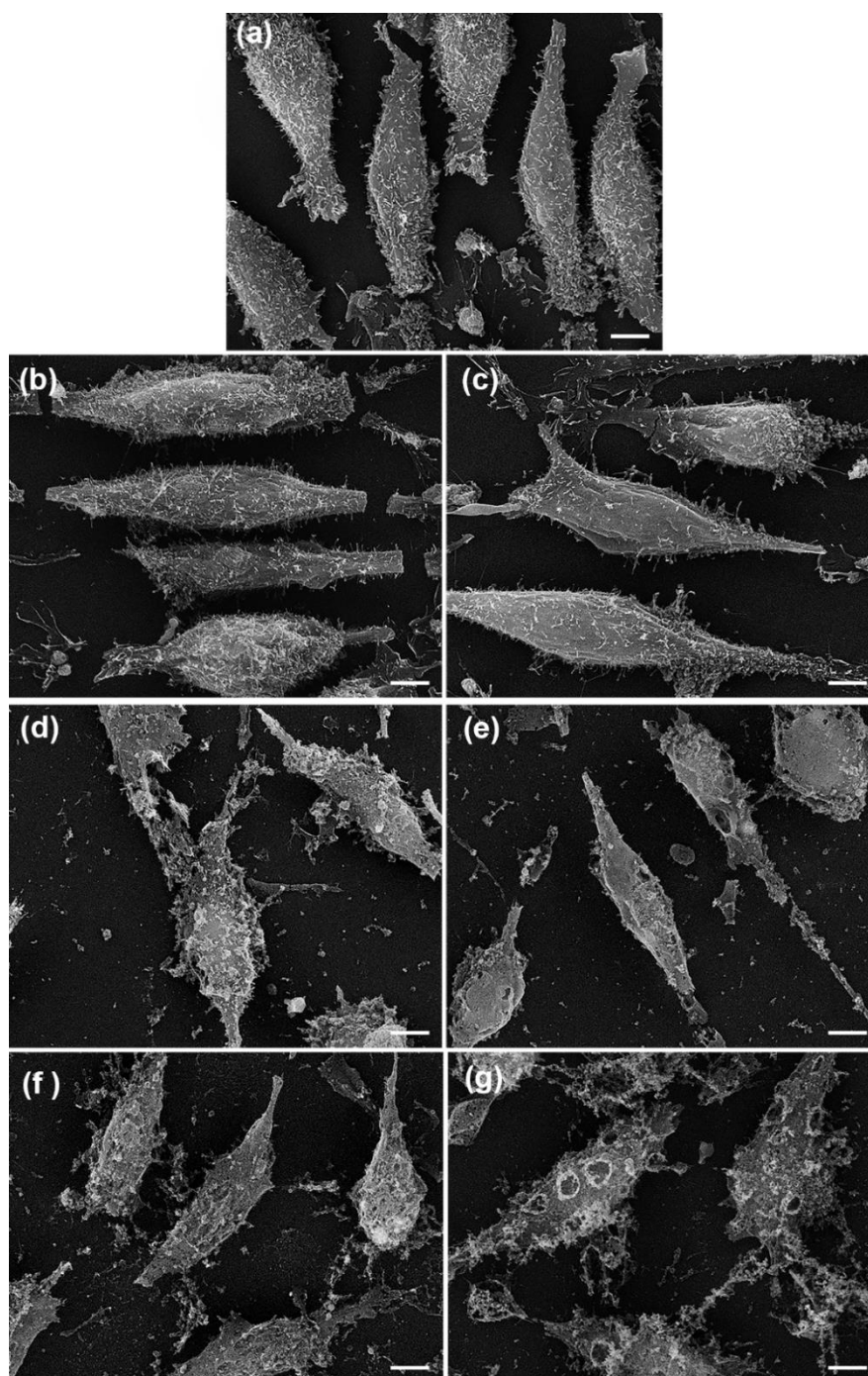
As células expostas ao NaOCl nas concentrações de 0,015 a 0,05% apresentavam características semelhantes aos controles. Nas concentrações acima de 0,05% as células apresentavam alterações estruturais progressivas severas incluindo perda de falopódios, alterações de formato e desestruturação caracterizando necrose (Figura 7). No grupo AP, as células expostas às concentrações de 0,015 e de 0,02% apresentavam características morfológicas semelhantes aos controles. Na concentração de 0,03%, as células apresentavam formas semelhantes aos grupos controles, porém com um número menor de falopódios. As células expostas ao AP em concentrações maiores que 0,03% apresentaram alterações estruturais progressivas apresentando-se completamente destruídas com características de necrose (Figura 8). Assim, as células expostas ao AP apresentaram alterações na morfologia externa em concentrações menores do que o NaOCl.

Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura. Imagens representativas do efeito do hipoclorito de sódio (NaOCl) em fibroblastos L929. (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles) apresentavam aspecto de normalidade com formato alongado/estrelado e presença de falopódios. As células apresentavam características morfológicas semelhantes ao controle nas imagens das concentrações de (b) 0,015 e 0,02%, (c) 0,03% e (d) 0,05%. Nas imagens representativas das concentrações (e) 0,08%, (f) 0,12%, (g) 0,18%, 0,26% e 0,4% apresentavam alterações estruturais progressivas severas incluindo perda de falopódios, alterações de formato e desestruturação caracterizando necrose. Barra=20µm.



Fonte: Elaboração própria

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura. Imagens representativas do efeito do ácido peracético (AP) em fibroblastos L929. (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam aspecto de normalidade com formato alongado/estrelado e presença de falopódios. (b) As células expostas ao AP a 0,015% e a 0,02%, apresentavam características morfológicas semelhantes ao controle. (c) Os fibroblastos expostos ao AP a 0,03%, apresentavam forma semelhante ao controle e menor número de falopódios. Nas imagens representativas das concentrações (d) 0,05%, (e) 0,08%, (f) 0,12%, (g) 0,18%, 0,26% e 0,4% apresentavam alterações estruturais progressivas severas incluindo perda de falopódios, alterações de formato e desestruturação caracterizando necrose. Barra=20µm.



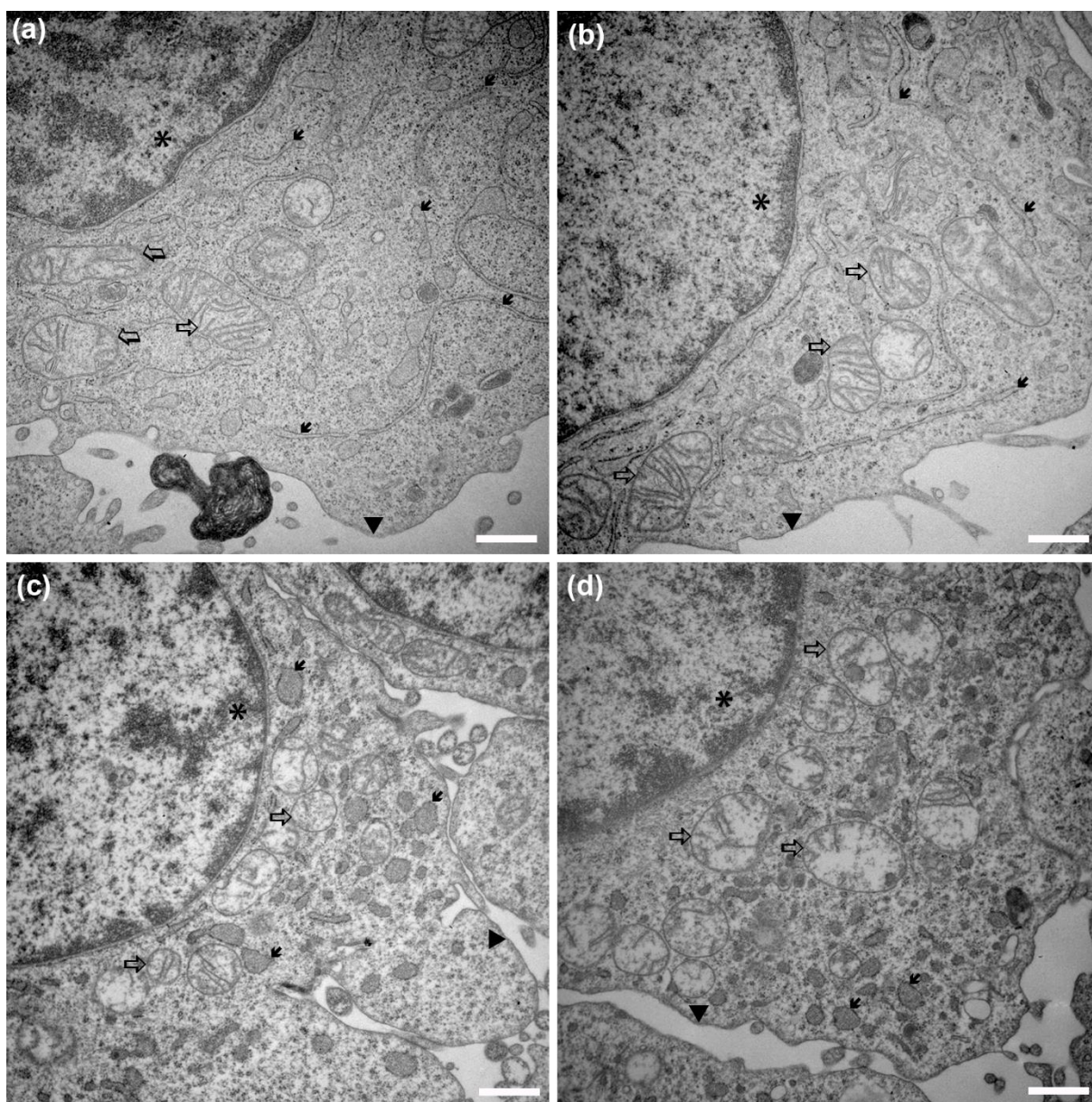
Fonte: Elaboração própria

Análise da ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão

As células expostas ao NaOCl na concentração de 0,05% apresentavam as estruturas semelhantes aos grupos controles. O tratamento das células com NaOCl a 0,08% levou a desestruturação das cristas mitocondriais e alteração na conformação do retículo endoplasmático rugoso que se apresentava como estruturas arredondadas, eletrodensas e com acúmulo de proteínas. Essas alterações foram agravadas progressivamente nas células tratadas com NaOCl a 0,12%, havendo vacuolização mitocondrial e acúmulo de estruturas eletrodensas (Figura 9). Nas maiores concentrações as células apresentavam características de necrose, ou seja, degradação dos componentes celulares e fragmentação da membrana.

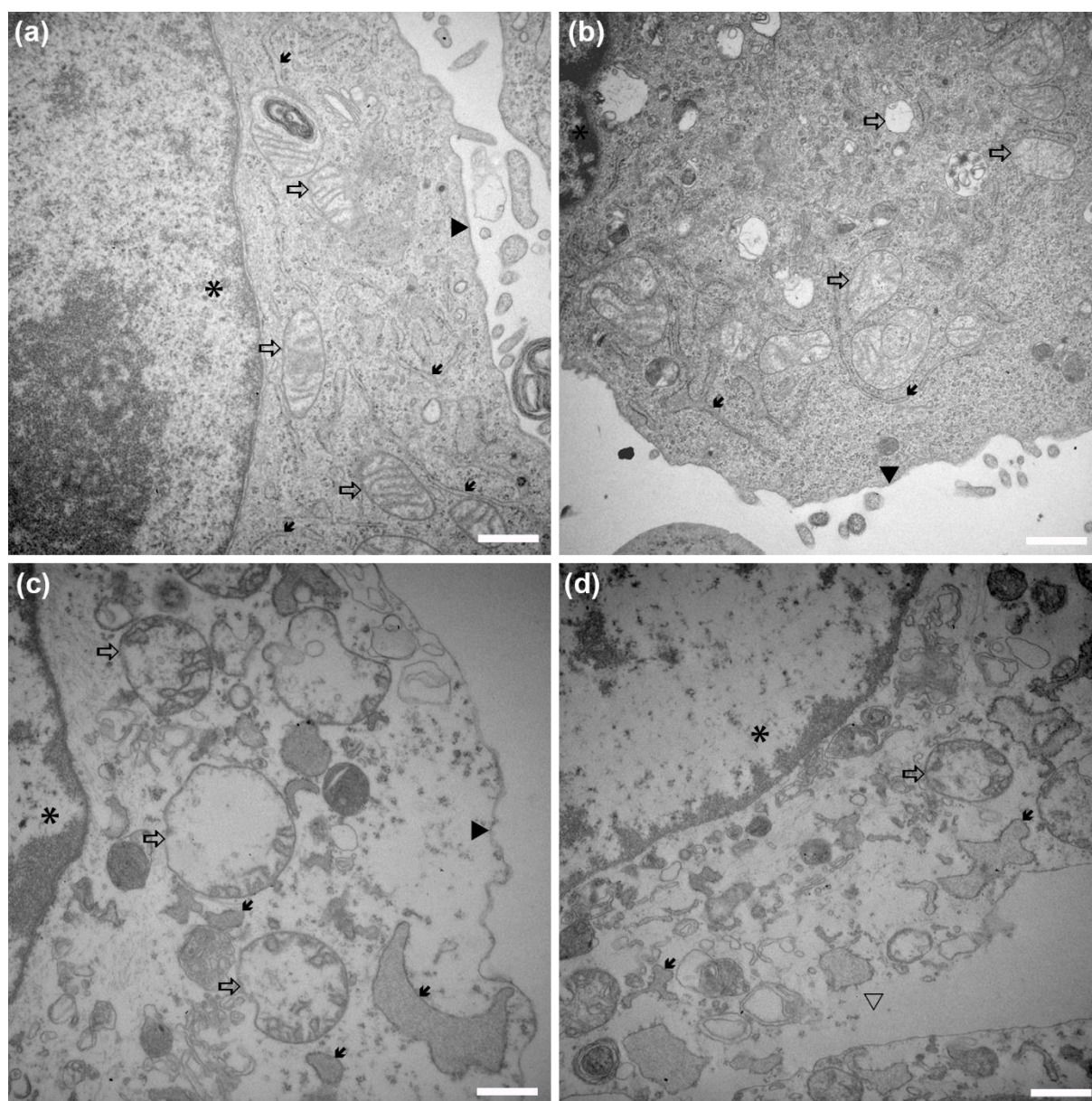
Os fibroblastos expostos ao AP na concentração de 0,05%, apresentavam cristas mitocondriais menos evidentes e vacúolos aparentemente vazios. Nas células expostas às concentrações de 0,08% e 0,12% houve dilatação do retículo endoplasmático rugoso com acúmulo de proteínas, vacuolização mitocondrial e degradação de componentes citoplasmáticos. Além disso, nas células tratadas com AP a 0,12% houve fragmentação da membrana celular, com derrame do conteúdo citoplasmático, caracterizando necrose (Figura 10). Tanto no grupo do AP, quanto no grupo do NaOCl não foram detectadas células com características de apoptose. Em resumo, as células expostas ao AP começaram a apresentar alterações ultraestruturais em concentrações menores que nas células expostas ao NaOCl. Entretanto, as duas soluções promoveram alterações ultraestruturais características de necrose celular.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão. Imagens representativas do efeito do hipoclorito de sódio (NaOCl) nos fibroblastos L929. (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam estruturas com aspecto normal. (b) As células expostas ao NaOCl a 0,05% apresentavam estruturas semelhantes ao grupo controle. (c) Na concentração de 0,08%, as células apresentavam alterações na conformação do retículo endoplasmático rugoso que mostrava-se como estruturas arredondadas e eletrodensas com acúmulo de proteínas. (d) Vacuolização mitocondrial e acúmulo de estruturas eletrodensas foram observados nas células expostas ao NaOCl a 0,12%. Cabeça de seta preenchida, membrana celular; seta vazia, mitocôndrias; asterísco, núcleos; seta preenchida, retículo endoplasmático rugoso. Barra = 1µm.



Fonte: Elaboração própria

Figura 10 - Microscopia eletrônica de transmissão. Imagens representativas do efeito do ácido peracético (AP) nos fibroblastos L929. (a) Os fibroblastos L929 expostos ao soro fisiológico e ao meio de cultura (controles), apresentavam estruturas com aspecto normal. (b) No grupo do AP a 0,05% as células apresentavam cristas mitocondriais menos evidentes e vacúolos aparentemente vazios. (c, d) Dilatação do retículo endoplasmático rugoso com acúmulo de proteínas, vacuolização mitocondrial e degradação de componentes citoplasmáticos, foram observados nas células expostas ao AP a 0,08% e 0,12%. (d) Na concentração de 0,12%, além da degradação dos componentes citoplasmáticos, houve fragmentação da membrana celular que são características de célula necrótica. Cabeça de seta preenchida, membrana celular; seta vazia, mitocôndrias; asterístico, núcleos; seta preenchida, retículo endoplasmático rugoso; cabeça de seta vazia, membrana celular rompida. Barra = 1µm.



Fonte: Elaboração própria

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos e o mecanismo de agressão celular do AP em comparação com o NaOCl sobre fibroblastos L929.

Utilizamos os fibroblastos da linhagem L929 porque eles são recomendados pela International Organization for Standardization N° 10993:5⁵⁸ (ISO 2009) e frequentemente empregados em testes de citotoxicidade de materiais odontológicos (Faria et al.³⁴, 2009; Donadio et al.²⁵, 2009; Aubut et al.³, 2010; Karapınar-Kazandag et al.⁶¹, 2011; Cotti et al.¹⁸, 2014; Wu et al.¹²⁹, 2015; Toh et al.¹²², 2015; Gomes-Filho et al.⁴⁷, 2016), por serem de fácil cultivo, apresentar ótima sensibilidade (Johnson et al.⁵⁹, 1983), estabilidade metabólica e genética e boa reprodutibilidade (Schmalz¹¹⁴, 1994).

O AP a 1% foi escolhido, pois nesta concentração ele apresenta eficácia antibacteriana semelhante ao NaOCl a 2,5%, à clorexidina a 2% (Dornelles-Morgental et al.²⁶, 2011) e ao EDTA a 17% + NaOCl a 2,5% (Cord et al.¹⁶, 2014) frente ao *Enterococcus faecalis*, e capacidade de remoção de *smear layer* quando empregado como solução irrigadora final (De-Deus et al.²², 2011). Não foi empregada concentração mais elevada pois se sabe que o AP a 2,25% causa maior remoção de alguns componentes minerais da dentina quando comparado ao EDTA a 17% (Cobankara et al.¹⁵, 2011). Além disso, foi levantada a hipótese de que o uso do AP a 2,25% por 3 minutos poderia levar a erosão da dentina (De-Deus et al.²², 2011).

Para a realização dos experimentos, as células foram incubadas com as soluções de NaOCl e de AP diluídas em soro fisiológico (Barsoumian et al.⁶, 2013), e não com os irrigantes diluídos em meio de cultura ou em PBS. Em ensaios preliminares, observamos que as soluções de NaOCl e de AP diluídas no meio de cultura e no PBS apresentaram um pH em torno de 8-8,5 devido às substâncias tamponantes presentes nestes dois meios. Quando diluídas no soro fisiológico, não houve alteração do pH, sendo que as soluções de AP apresentaram pH de 3,81 a 5,13 e as de NaOCl um pH variando de 8,96 a 7,51 (dados não mostrados), sendo estes valores das soluções mais concentradas para as mais diluídas, respectivamente. Experimentos piloto, empregando ensaio de MTT, mostraram que não houve diferença na toxicidade do AP a 1% e do NaOCl a 2,5% quando os fibroblastos foram expostos aos irrigantes diluídos em meio de cultura. No entanto, prática clínica os irrigantes não são tamponados para o uso e, conseqüentemente, esta metodologia poderia levar a resultados não verdadeiros. Optamos por efetuar a diluição no soro fisiológico para não alterar as características dos irrigantes e simular,

assim, a situação clínica de uso. Além disso, a neutralização do pH do NaOCl a 2,5% aumenta a sua citotoxicidade (Aubut et al.³, 2010).

O tempo de 10 minutos de incubação das células com os irrigantes foi escolhido para simular o tempo de preparo químico mecânico do canal radicular (Schäfer, Florek ¹¹³, 2003) e também para evitar danos às células, uma vez que o soro fisiológico não contém nutrientes. Tempos de 5 minutos a 48 horas de contato da solução irrigadora com as células têm sido empregados para avaliação da citotoxicidade (Aubut et al.³, 2010; Essner et al.³⁰, 2011; Barsoumian et al.⁶, 2013). Em alguns estudos, o irrigante permanece em contato com as células pelo período total de avaliação (Hidalgo et al.⁵⁵, 2002; Aubut et al.³, 2010; Barsoumian et al.⁶, 2013) e em outros, após curtos tempos de contato, o irrigante é removido e as células são incubadas com meio de cultura por períodos de 4 horas (Giannelli et al.⁴⁴, 2008) ou 24 horas (Essner et al.³⁰, 2011). Em ensaios pilotos (dados não mostrados), verificamos que quando as células ficaram incubadas com meio de cultura por 24 horas, após a remoção dos irrigantes, havia um nivelamento dos resultados. Isto significa que tempos de recuperação das células por 24 horas pode impedir a identificação das diferenças de citotoxicidade. Por isso, escolhemos o tempo de incubação de 4 horas das células com o meio de cultura após a remoção dos irrigantes (Giannelli et al.⁴⁴, 2008).

Os resultados dos ensaios realizados no presente estudo mostraram que o AP na concentração de 1% apresentou maior citotoxicidade do que o NaOCl a 2,5%.

A ação dos irrigantes sobre a função mitocondrial foi avaliada empregando o ensaio de MTT. O ensaio de MTT é considerado o teste padrão para avaliar a toxicidade de materiais odontológicos em cultura celular (ISO⁵⁷ 10993-2005; Al Anezi et al.¹, 2010; Zhang et al.¹³⁴, 2010; Simbula et al.¹¹⁵, 2010; Forster et al.³⁸, 2014; Petrović et al.⁹⁷, 2015; Botton et al.⁸, 2015; Kamonwanon et al.⁶⁰, 2015). Ele é um ensaio rápido, preciso e de fácil realização (Gomes-Filho et al.⁴⁶, 2009; Bin et al.⁷, 2012). Este ensaio é baseado na habilidade da enzima mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan (roxo), cuja absorbância é proporcional a quantidade de células viáveis/metabolicamente ativas (Mosmann⁸⁴, 1983; Petrović et al.⁹⁷, 2015). Neste estudo, as soluções de NaOCl a 2,5% e de AP a 1% apresentaram efeito no metabolismo celular de maneira dose-dependente, ou seja, tanto o AP, quanto o NaOCl levaram a diminuição da viabilidade celular conforme aumentou concentração das soluções. No entanto, no grupo do AP houve menor viabilidade celular do que no grupo do NaOCl nas concentrações intermediárias.

O tipo de morte celular provocado pelos irrigantes também foi avaliado. Segundo Kumar et al.⁶⁶ (2013), existem dois tipos de morte celular, necrose e apoptose. Necrose é o tipo de morte celular que está associado à perda da integridade da membrana e extravasamento dos conteúdos celulares, culminando na dissolução das células, resultante da ação degradativa de enzimas. É caracterizada também pelo inchaço celular, digestão da cromatina e hidrólise do DNA (Orrenius et al.⁹³, 2015). Os conteúdos celulares que escapam iniciam uma inflamação local com a finalidade de eliminar as células mortas (Edinger et al.²⁷, 2004; Festjens et al.³⁵, 2006). A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é uma forma ativa de morte celular, caracterizada pela contração da membrana celular e condensação da cromatina, seguida pela fragmentação nuclear, envolvendo a ativação das caspases específicas (Orrenius et al.⁹³, 2015). Diferentemente da necrose, as células apoptóticas e seus fragmentos são rapidamente removidos, não promovendo reação inflamatória (Kumar et al.⁶⁶, 2013). Se um material endodôntico induz principalmente a apoptose, o dano para o tecido periapical é supostamente limitado, ao passo que os materiais que induzem a necrose celular (Ciapetti et al.¹⁴, 2000) podem retardar o reparo periapical. Por meio da avaliação em MET, nos grupos do AP e do NaOCl foram detectadas células com características de necrose, mas não de apoptose. Os resultados da citometria de fluxo mostraram que o AP e o NaOCl induziram a morte das células predominantemente por necrose, sendo que o percentual das células mortas aumentou conforme aumentou a concentração dos irrigantes. Estes resultados podem ser explicados pelo fato do NaOCl (Estrela et al.³¹, 2002; Prado et al.¹⁰⁰, 2013; Pechacek et al.⁹⁸, 2015) e do AP (Brasileiro et al.⁹, 2001; Pechacek et al.⁹⁸, 2015) serem agentes oxidantes e, consequentemente, os radicais livres podem causar a peroxidação dos lipídios das membranas plasmática e das organelas. A lesão oxidativa é iniciada quando as ligações duplas dos ácidos graxos das membranas são atacadas por radicais livres (derivados do oxigênio). As interações lipídios radicais livres produzem peróxidos que também são instáveis e reativos, iniciando uma reação autocatalítica em cadeia, que pode resultar em extenso dano das membranas e organelas das células e consequentemente morte celular (Kumar⁶⁵⁻⁶⁶, 2005, 2013). Estudo anterior também mostrou que o NaOCl não induz quantidade significativa de apoptose (Nishikiori et al.⁹¹, 2008).

Investigações morfológicas microscópicas são necessárias para comprovar a toxicidade e tipo de morte celular (Taates et al.¹²⁰, 2008). A avaliação da morfologia externa das células por meio de MEV tem sido empregada para avaliar a citotoxicidade de materiais odontológicos (Faria et al.³⁴, 2009; Zhou et al.¹³⁵, 2015; Hashimoto et al.⁵³, 2016). A análise em MEV mostrou que o AP e o NaOCl levaram a alterações morfológicas nos fibroblastos L929 que foram

proporcionais à concentração das soluções. Com o aumento da concentração, as células apresentaram diminuição e perda dos falopódios, alteração na forma e desestruturação/degradação, sendo estas últimas características de necrose (Kumar⁶⁵⁻⁶⁶, 2005, 2013). Estas alterações celulares se iniciaram em concentrações menores do AP quando comparado com o NaOCl. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou resultados concordantes com a avaliação em MEV; o AP induziu alterações celulares ultraestruturais em concentrações menores do que o NaOCl. O AP e o NaOCl levaram a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso com acúmulo de proteínas, vacuolização mitocondrial e degradação de componentes citoplasmáticos e fragmentação da membrana celular, com derrame do conteúdo citoplasmático, caracterizando necrose (Kumar et al.⁶⁶, 2013). O acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático rugoso leva ao stress celular, que se for muito intenso, pode ativar a morte das células (Kincaid e Cooper⁶⁴, 2007; Faria et al.³⁴, 2009). O retículo endoplasmático é o local de síntese e dobramento de proteínas, destinadas para secreção, membrana celular, aparelho de Golgi e lisossomos. Proteínas não dobradas ou dobradas incorretamente não podem ser exportadas para o aparelho de Golgi (Kaufman⁶², 2002; Schröder and Kaufman¹¹⁸, 2005). Estudos prévios têm mostrado que proteínas não dobradas ou dobradas incorretamente podem ocorrer sob várias circunstâncias, incluindo exposição a toxinas, idade e stress oxidativo (Paschen e Frandsen⁹⁵, 2001; Kaufman⁶², 2002). Winter et al.¹²⁸ (2008) mostraram que o NaOCl leva a agregação e não dobramento oxidativo de proteínas.

Mudanças na forma das células podem ocorrer devido a alterações na estrutura do citoesqueleto (Runnegar, Falconer¹⁰⁶, 1986). O citoesqueleto é composto por filamentos que funcionam como âncoras conectando a membrana plasmática ao interior da célula. Além disso, os filamentos exercem as funções de manutenção da arquitetura, na motilidade e na sinalização de células normais (Kumar et al.⁶⁶, 2013). A força de tensão celular é fornecida pelos filamentos intermediários, ao passo que a manutenção da arquitetura das células, a organização espacial das organelas e o tráfico vesicular são conferidos pelos microtúbulos e proteínas motoras associadas (Euteneuer, Schliwa³², 1984). Um grande número de xenobióticos interfere com a organização do citoesqueleto (Mannherz et al.⁷⁸, 2006; Frese et al.⁴⁰, 2014), levando à ruptura e desaparecimento dos microtúbulos, dos microfilamentos e dos filamentos intermediários (Majno, Joris⁷⁷, 2004; Gunaratnam, Grant⁵⁰, 2004; Rudolf et al.¹⁰⁵, 2005; Mannherz et al.⁷⁸, 2006). Além disso, podem induzir a despolimerização (Scanlon et al.¹¹², 1989) ou inibir a sua polimerização (Gunaratnam, Grant⁵⁰, 2004;). O efeito do AP e do NaOCl foi observado nos microfilamentos (actina) e nos microtubulos (α -tubulina), que são os maiores determinantes da

morfologia celular. O processo progressivo de destruição da citoarquitetura pelo AP e pelo NaOCl foi coincidente as alterações celulares observadas na MEV. Por isso, mudanças na morfologia celular induzidas pelo AP e NaOCl foram provavelmente causadas pelas alterações na integridade do citoesqueleto, como a ruptura e redistribuição dos microfilamentos (Eriksson et al.²⁹, 1989; Hooser et al.⁵⁶, 1991) e dos microtúbulos (Khan et al.⁶³, 1995).

A resposta das células ao NaOCl mostrada nesse estudo, está condizente com estudos anteriores que também relataram a sua citotoxicidade de forma dose dependente (Aubut et al.³, 2010; Simbula et al.¹¹⁵, 2010; Ryu et al.¹⁰⁸, 2013; Vouzara et al.¹²⁶, 2015).

Em relação ao AP, os fabricantes normalmente afirmam que devido a sua biodegradabilidade, ele é minimamente tóxico na concentração utilizada para a desinfecção (Loukili et al.⁷⁶, 2004). No entanto, não há estudos na literatura avaliando o seu efeito sobre fibroblastos.

Nossos resultados mostram que mesmo as duas soluções promovendo o mesmo tipo de morte celular, alterações metabólicas, estruturais e ultraestruturais semelhantes, o grupo do AP induziu estas alterações em concentrações menores do que o NaOCl. A maior toxicidade do AP em relação ao NaOCl poderia ser explicada pela acidez do AP (3,81 a 5,13) nas concentrações usadas no presente estudo (Chan et al.¹⁹, 1999) e/ou pelo seu maior potencial de oxidação em relação ao cloro (Kitis et al.⁷⁰, 2004).

6 CONCLUSÃO

Concluimos que o AP a 1% é mais citotóxico do que o NaOCl a 2,5%. No entanto, ambos apresentam o mesmo mecanismo de citotoxicidade; diminuem o metabolismo celular, levam a desestruturação do citoesqueleto, alterações na morfologia externa, acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático rugoso e induzem morte celular predominantemente por necrose.

REFERÊNCIAS*

1. Al Anezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(3): 122–5.
2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. Washington, DC: American Public Health Association; 2012.
3. Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsière T, Garcia S, About I, et al. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(2): 120-5.
4. Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O, Muftuoglu S, Zeybek ND, Küçükkaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014; 20: 22-6.
5. Baldry MG. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol.* 1983; 54(3): 417-23.
6. Barsoumian A, Sanchez CJ, Mende K, Tully CC, Beckius ML, Akers KS, et al. In vitro toxicity and activity of Dakin's solution, mafenide acetate, and amphotericin B on filamentous fungi and human cells. *J Orthop Trauma.* 2013; 27(8): 428-36.
7. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(4): 495-500.
8. Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB, et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J.* 2015, Jul 14. [Epub ahead of print]

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.
Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

9. Brasileiro LB, Colodette JL, Piló-Veloza D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Quím. Nova*. 2001; 24(6): 819-29.
10. British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. Cleaning and disinfection of equipment for gastrointestinal endoscopy. Report of a working party of the British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. *GUT*. 1998; 42(4): 585-93.
11. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985; 18(1): 35-40.
12. Carvalho MR, dos Santos da Silva MA, de Sousa Brito CA, Campelo V, Kuga MC, Tonetto MR, et al. Comparison of antimicrobial activity between chemical disinfectants on contaminated orthodontic pliers. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(8): 619-23.
13. Ceretta R, Paula MMS, Angioletto Ev, Meier MM, Mitellstadt FG, Pich CT, et al. Evaluation of the effectiveness of peracetic acid in the sterilization of dental equipment. *Indian J Med Microbiol*. 2008; 26(2): 117-22.
14. Ciapetti G, Granchi D, Cenni E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Cytotoxic effect of bone cements in HL-60 cells: distinction between apoptosis and necrosis. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52(2): 338-45.
15. Cobankara FK, Erdogan H, Hamurcu M. Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(6): e149-54.
16. Cord CB, Velasco RV, Ribeiro Melo Lima LF, Rocha DG, da Silveira Bueno CE, Pinheiro SL. Effective analysis of the use of peracetic acid after instrumentation of root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2014; 40(8): 1145-8.

17. Costa SA, Paula OF, Silva CR, Leão MV, Santos SS. Stability of antimicrobial activity of peracetic acid solutions used in the final disinfection process. *Braz Oral Res.* 2015; 29. pii: S1806-83242015000100239.
18. Cotti E, Petreucic V, Re D, Simbula G. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an in vitro study. *J Endod.* 2014; 40(1): 124-8.
19. Chan CP, Jeng JH, Hsieh CC, Lin CL, Lei D, Chang MC. Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. *J Endod.* 1999; 25(5): 354-8.
20. Chassot ALC, Poisl MI, Samuel SMW. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J.* 2006; 17(2): 117-21.
21. Dai X, Luo H, Jiang L, Ling L, Xue Y, Yu Z. Efficacy of different sanitizing agents and their combination on microbe population and quality of fresh-cut chinese chives. *J Food Sci.* 2012; 77(7): M348-53.
22. De-Deus G, Souza EM, Marins JR, Reis C, Paciornik S, Zehnder M. Smear layer dissolution by peracetic acid of low concentration. *Int Endod J.* 2011; 44(6): 485-90.
23. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA, et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(8): 2067-73.
24. de Sermeño RF, da Silva LA, Herrera H, Herrera H, Silva RA, Leonardo MR. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(1): e46–9.

25. Donadio M, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(6): e74-8.
26. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(3): 396-400.
27. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(6): 663-9.
28. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003; 29(5): 338-9.
29. Eriksson JE, Paatero GI, Meriluoto JA, Codd GA, Kass GE, Nicotera P, et al. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp Cell Res.* 1989; 185(1):86-100.
30. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 662-6.
31. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13(2): 113-7.
32. Euteneuer U, Schliwa M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature.* 1984; 310(5972): 58-61.
33. Faria G, Nelson-Filho P, Freitas AC, Assed S, Ito IY. Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2005; 13(4): 351-5.

34. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 234(2): 256-65.
35. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757(9-10): 1371-87.
36. Fernandes FH, Orsi IA, Villabona CA. Effects of the peracetic acid and sodium hypochlorite on the colour stability and surface roughness of the denture base acrylic resins polymerised by microwave and water bath methods. *Gerodontology.* 2013; 30(1): 18-25.
37. Finnegan M, Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(10): 2108-15.
38. Forster A, Ungvári K, Györgyey Á, Kukovecz Á, Turzó K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *J Dent.* 2014; 42(1): 7-14.
39. Fraser JAL, Godfree AF, Jones F. Use of peracetic acid in operational sewage sludge disposal to pasture. *Water Sci Technol.* 1984;17:451– 66.
40. Frese C, Wolff D, Zingler S, Krueger T, Stucke K, Lux CJ, et al. Cytotoxicity of coated and uncoated fibre-reinforced composites. *Acta Odontol Scand.* 2014; 72(5): 321-30.
41. Gaddala N, Veeramachineni C, Tummala M. Effect of peracetic acid as a final rinse on push out bond strength of root canal sealers to root dentin. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(5): ZC75-7.
42. Garcia F, Murray PE, Garcia-Godoy F, Namerow KN. Effect of aquatine endodontic cleanser on *smear layer* removal in the root canals of ex vivo human teeth. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(4): 403-8.

43. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004; 37(4): 272–80.
44. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(2): 308-17.
45. Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MM, Bernabé PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(2): 137-44.
46. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod*. 2009; 35(11): 1577-9.
47. Gomes-Filho JE, Sivieri-Araujo G, Sipert CR, da Silva Santos LM, de Azevedo Queiroz ÍO, Men Martins C, et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016; 13: 97-100.
48. Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension. *J Hosp Infect*. 1999; 41(2): 111–21.
49. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Faria-Junior NB, Berbert FLCV, Tanomaru-Filho M. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2011; 22(4): 285-7.
50. Gunaratnam M, Grant MH. Damage to F-actin and cell death induced by chromium VI and nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(3): 245-53.
51. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000; 33(2): 126-31.

52. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014; 216(6): 299-303.
53. Hashimoto M, Sasaki JI, Imazato S. Investigation of the cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles and nanowires and their localization in L929 fibroblasts and RAW264 macrophages. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016; 104(2): 241-52.
54. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J.* 2010; 43(11): 968-77.
55. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem Biol Interact.* 2002; 139(3): 265-82.
56. Hooser SB, Beasley VR, Waite LL, Kuhlenschmidt MS, Carmichael WW, Haschek WM. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Vet Pathol.* 1991; 28(4): 259-66.
57. International Organization for Standardization. ISO 10993-18: biological evaluation of medical devices -- Part 18: chemical characterization of materials. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
58. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, Switzerland: ISO; 2009.
59. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ, Wallin RF. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. *J Biomed Mater Res.* 1983; 17(4): 571-86.
60. Kamonwanon P, Yodmongkol S, Chantarachindawong R, Thaweeboon S, Thaweeboon B, Sriksirin T. Wear resistance of a modified polymethyl methacrylate artificial tooth

- compared to five commercially available artificial tooth materials. *J Prosthet Dent*. 2015; 114(2): 286-92.
61. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2011; 44(7): 626-34.
 62. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*. 2002; 110(10): 1389–98.
 63. Khan AS, Ghosh S, Wickstrom M, Miller LA, Hess R, Haschek W, et al. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. *Nat Toxins*. 1995; 3(3): 119-28.
 64. Kincaid MM, Cooper AA. ERADicate ER stress or die trying. *Antioxid. Redox. Signal*. 2007; 9(12): 2373–87.
 65. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. cap.1, p.3-47.
 66. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia básica*. 9^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. cap.1, p.1-28.
 67. Kanisavaran ZM. Chlorhexidine gluconate in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008; 58(5): 247-57.
 68. Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Root canal medicaments. *Int Dent J*. 2009; 59(1): 5-11.
 69. Kerkaert B, Mestdagh F, Cucu T, Aedo PR, Ling SY, De Meulenaer B. Hypochlorous and peracetic acid induced oxidation of dairy proteins. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(3): 907-14.

70. Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environ Int.* 2004; 30(1): 47-55.
71. Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *J Hosp Infect.* 2010; 76(4): 345-50.
72. Kuga MC, Gouveia-Jorge E, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Bonetti-Filho I, Faria G. Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(6): e 155-9.
73. Lee SH, Cappato LP, Corassin CH, Cruz AG, Oliveira CA. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *J Dairy Sci.* 2016; 99(3): 2384-90.
74. Lensing HH, Oei HL. Investigations on the sporicidal and fungicidal activity of disinfectants. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.* 1985; 181(6): 487-95.
75. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009; 42(4): 335-43.
76. Loukili NH, Becker H, Harno J, Bientz M, Meunier O. Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. *J Hosp Infect.* 2004; 58(2): 151-4.
77. Majno G, Joris I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology. 2nd ed. New York: Oxford University Press: 2004; cap.4, p. 128-85.
78. Mannherz HG, Gonsior SM, Wu X, Polzar B, Pope BJ, Wartosch L, et al. Dual effects of staurosporine on A431 and NRK cells: microfilament disassembly and uncoordinated lamellipodial activity followed by cell death. *Eur J Cell Biol.* 2006; 85(8): 785-802.
79. Martell AE, Motekaitis RJ. Determination and use of stability constants. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1992.

80. Martinho FC, Carvalho CA, Oliveira LD, de Lacerda AJ, Xavier AC, Augusto MG, et al. Comparison of different dentin pretreatment protocols on the bond strength of glass fiber post using self-etching adhesive. *J Endod*. 2015; 41(1): 83-7.
81. Mattle MJ, Crouzy B, Brennecke M, Wigginton KR, Perona P, Kohn T. Impact of virus aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants. *Environ Sci Technol*. 2011; 45(18): 7710-7.
82. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008; 58(6): 329-41.
83. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009; 42(4): 288-302.
84. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
85. Montebugnoli L, Chersoni S, Prati C, Dolci G. A between-patient disinfection method to control water line contamination and biofilm inside dental units. *J Hosp Infect*. 2004; 56(4): 297-304.
86. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004; 30(11): 785-7.
87. Nagas E, Cehreli ZC, Ozgur Uyanik M, Durmaz V, Vallittu PK, Lassila LV. Bond strength of mineral trioxide aggregate to root dentin after exposure to different irrigation solutions. *Dent Traumatol*. 2014; 30(3): 246-9.
88. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99(2): 231-52.

89. Nascimento MS, Silva N, Catanozi MP, Silva KC. Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. *J Food Prot.* 2003; 66(9): 1697-700.
90. Neelakantan P, Sharma S, Shemesh H, Wesselink PR. Influence of irrigation sequence on the adhesion of root canal sealers to dentin: a fourier transform infrared spectroscopy and push-out bond strength analysis. *J Endod.* 2015; 41(7): 1108-11.
91. Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, Okazaki M. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent.* 2008; 36(12): 993-8.
92. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(3-4): 424-31.
93. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 460(1): 72-81.
94. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent.* 2015; 28(3): 150-6.
95. Paschen W, Frandsen A. Endoplasmic reticulum dysfunction — a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J Neurochem.* 2001; 79(4): 719–25.
96. Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties: a review. *J Dent.* 2009; 37(12): 903-8.
97. Petrović V, Opačić-Galić V, Zivković S, Nikolić B, Danilović V, Miletić V, et al. Biocompatibility of new nanostructural materials based on active silicate systems and hydroxyapatite: in vitro and in vivo study. *Int Endod J.* 2015; 48(10): 966-75.

98. Pechacek N, Osorio M, Caudill J, Peterson B. Evaluation of the toxicity data for peracetic acid in deriving occupational exposure limits: a minireview. *Toxicol Lett.* 2015; 233(1): 45-57.
99. Pladisai P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Effectiveness of different disinfection protocols on the reduction of bacteria in *Enterococcus faecalis* biofilm in teeth with large root canals. *J Endod.* 2016; 42(3): 460-4.
100. Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simão RA, et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod.* 2013; 39(4): 505–10.
101. Rossi S, Antonelli M, Mezzanotte V, Nurizzo C. Peracetic acid disinfection: A feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environ. Res.* 2007; 79(4): 341–50.
102. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod.* 2010; 36(1): 1-15.
103. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Lopes WS, Vieira AR, Rôças IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod.* 2015; 41(2): 265-73.
104. Ricucci D, Candeiro GT, Bugea C, Siqueira JF Jr. Complex apical intraradicular infection and extraradicular mineralized biofilms as the cause of wet canals and treatment failure: report of 2 cases. *J Endod.* 2016; 42(3): 509-15.
105. Rudolf E, Cervinka M, Cerman J, Schroterova L. Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* 2005; 19(6): 713-23.
106. Runnegar MT, Falconer IR. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon.* 1986; 24(2): 109-15.

107. Rutala WA, Weber DJ. Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998; 19(10): 789-804.
108. Ryu M, Matsumura R, Quan G, Furuta T. Comparison of the cytotoxicity of high-level disinfectants by the MTT assay and direct contact assay. *Biocontrol Sci*. 2013; 18(4): 221-5.
109. Sagsen B, Ustun Y, Aslan T, Canakci BC. The effect of peracetic acid on removing calcium hydroxide from the root canals. *J Endod*. 2012; 38(9): 1197-201.
110. Salvia AC, Teodoro GR, Balducci I, Koga-Ito CY, Oliveira SH. Effectiveness of 2% peracetic acid for the disinfection of gutta-percha cones. *Braz Oral Res*. 2011; 25(1): 23-7.
111. Samuel SM, Fracaro GB, Collares FM, Leitune VC, Campregher UB. Influence of a peracetic acid-based immersion on indirect composite resin. *Eur J Prosthodont Rest Dent*. 2011; 19(2): 52-4.
112. Scanlon M, Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Cytolysis by tumor necrosis factor is preceded by a rapid and specific dissolution of microfilaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(1): 182-6.
113. Schäfer E, Florek H. Efficiency of rotary nickel-titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J*. 2003; 36(3): 199-207.
114. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials advantages and limitations. *J Dent*. 1994; 22 Suppl 2: S6-11.
115. Simbula G, Dettori C, Camboni T, Cotti E. Comparison of tetraacetythylenediamine + sodium perborate and sodium hypochlorite cytotoxicity on L929 fibroblasts. *J Endod*. 2010; 36(9): 1516–20.

116. Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal, in vitro. *Int Endod J*. 1997; 30(4): 279-82.
117. Siqueira Jr JF. Etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001; 34(1): 1-10.
118. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 739-89.
119. Subha N, Prabhakar V, Koshy M, Abinaya K, Prabu M, Thangavelu L. Efficacy of peracetic acid in rapid disinfection of Resilon and gutta-percha cones compared with sodium hypochlorite, chlorhexidine, and povidone-iodine. *J Endod*. 2013; 39(10): 1261-4.
120. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129(1): 33-43.
121. Tanomaru-Filho M, Silveira BR, Martelo RB, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of concentration and agitation of sodium hypochlorite and peracetic acid solutions on tissue dissolution. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(11): 876-9.
122. Toh WS, Yap A, Lim SY. In vitro biocompatibility of contemporary bulk-fill composites. *Oper Dent*. 2015; 40(6): 644-52.
123. van der Meer WJ, Vissink A, Ng YL, Gulabivala K. 3D Computer aided treatment planning in endodontics. *J Dent*. 2016; 45: 67-72.
124. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39-51.

125. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010; 43(1): 2-15.
126. Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2015. doi: 10.1111/iej.12517.
127. Walter EH, Nascimento MS, Kuaye AY. Efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid in sanitizing green coconuts. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49(3): 366-71.
128. Winter J, Ilbert M, Graf PC, Ozcelik D, Jakob U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell.* 2008; 135(4): 691-701.
129. Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2015; 48(3): 268-76.
130. Wuerch RM, Apicella MJ, Mines P, Yancich PJ, Pashley DH. Effect of 2% chlorhexidine gel as an intracanal medication on the apical seal of the root-canal system. *J Endod.* 2004; 30(11): 788-91.
131. Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *J Endod.* 2010; 36(2): 260-3.
132. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(6): 756-62.
133. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5): 389-98.
134. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(9): 769-74.

135. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod*. 2015; 41(1): 56-61.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de março de 2016.

KENNIA SCAPIN VIOLA