

Paulo Tadeu da Silva

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM RELAÇÃO
AOS REATIVOS INTERMEDIÁRIOS DO
OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM CULTURAS DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE
CAMUNDONGOS**

**ARARAQUARA
2004**

Paulo Tadeu da Silva

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM RELAÇÃO AOS REATIVOS INTERMEDIÁRIOS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista, para a obtenção do título de Doutor
em Endodontia.

Orientador: **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**

**ARARAQUARA
-2004-**

Silva, Paulo Tadeu

Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos em relação aos reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. / Paulo Tadeu da Silva. – Araraquara: [s.n.], 2004.

171 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

1. Sobrevivência celular 2. Óxido nítrico 3. Peróxido de hidrogênio 4. Citotoxicidade celular anticorpo-dependente 5. Materiais restauradores do canal radicular I. Título.

Paulo Tadeu da Silva

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS EM RELAÇÃO AOS REATIVOS
INTERMEDIÁRIOS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM
CULTURAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE
CAMUNDONGOS

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

2º Examinador: Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama

3º Examinador: Prof. Dr. Abílio Albuquerque Maranhão de Moura

4º Examinador: Prof. Dr. Iracilda Zeppone Carlos

5º Examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Araraquara, 30 de agosto de 2004

Dados Curriculares

Paulo Tadeu da Silva

N A S C I M E N T O	20.5.1953 – ITIRAPINA/SP
F I L I A Ç Ã O	Waldyr Lage Silva Wanda Aparecida Vieira da Silva
1 9 7 2 / 1 9 7 6	Curso de Graduação Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP
1 9 7 5	Monitor da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP
1 9 7 6 / 1 9 7 7	Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP
2 0 0 0 / 2 0 0 3	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
1 9 9 6 / 2 0 0 4	Professor do Curso de Especialização em Endodontia da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas-Regional de São Carlos-SP
2 0 0 3 / 2 0 0 4	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

À **Deus**, Senhor e fonte de amor e sabedoria eterna por ter permitido que eu conquistasse mais uma etapa em minha vida.

Ao meu pai **Waldyr Lage**

Silva (In Memoriam), à minha mãe

Wanda, ao meu irmão **Carlos**,

que conduziram a minha caminhada, esta oração:

"Ave Maria, grátia plena. Dóminus tecum: benedíctá tu in mulieribus, et benedíctus fructus ventris tui Jesus.

Sancta Maria, Mater Dei, ora pro nobis precatóribus, minc et in hora mortis nostrae.

Ame"

Pater noster, quies in caelis, sanctificetur nomen tuum.

Advénia tua, sicut in caelo et in terra.

Panem nostrum, quotidianaunum da nóbis hódie. Et dimítte nobis débita nostra, sicut et nas dimittimus debitóribus nostris. Et ne nos induças in tentationem: sed líberanos a mala. Amén".

À **Cristina**, minha esposa, pelo

apoio e ajuda na concentração deste trabalho.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo:**

Através de sua amizade, gestos, sabedoria, empenho, paciência e uma dedicação de maneira ímpar, formou um discípulo e admirador, é considerado um dos "Luminares" da Endodontia Técnica e Biológica.

À **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**, que com sua sabedoria, paciência, perspicácia, soube transmitir seus ensinamentos seguros e objetivos, para que durante a minha caminhada, pudesse chegar a recompensa final, da realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, "Ícone da Endodontia Biológica", com o seu expressionismo, no seu modo de agir, pensar como pessoa humana, sensível, pesquisador e orientador, responsável pela minha formação na Endodontia e também de muitos discípulos seguidores do mesmo, é um exemplo de dignidade e personalidade como ser humano.

Ao Amigo e Colega **Dr. Marcos Jacobovitz**, pelo apoio e incentivos constantes à minha pessoa.

Meus Agradecimentos

Ao **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérice Marcantonio**, Diretora e **Prof. Dr. José Carlos Martins Segalla**, Vice-Diretor da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Ao **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, Ex-Coordenador e **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, Atual Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, em níveis de Mestrado e Doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Aos **Profs. Drs. Roberto Miranda Esberard, Idomeo Bonetti Filho, Mário Tanomaru Filho e Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, meus respeitos e agradecimentos aos ensinamentos e atenção que me devotaram.

Ao **Prof. Dr. Jayme Maurício Leal**, "In Memoriam", pelo conhecimento, convivência e amizade, durante o nosso convívio, como Professor e Aluno.

Ao **Prof. Dr. Welington Dinelli**, pelo apoio e estímulo na realização do Curso de Doutorado em Endodontia.

A todos os **Professores do Curso de Pós-Graduação**, pelos conhecimentos, apoio e amizade a mim dedicados.

Ao **C.E.E.A.**, pela compreensão, paciência e dignidade na aprovação do projeto para realização deste trabalho.

À **Maria Helena Matsumoto Komasti Leves** e **Maria José Peron**, pela revisão das novas normas bibliográficas.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia **Sr. Pedro** e **Sra. Luiza**.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, **Mara, Vera, Rosangela** e **Silvia**, pela ajuda, orientação, atenção e amizade.

À **Lívia**, pelo apoio constante nos inmensuráveis conhecimentos na área de computação.

À **Célia Regina Fachine Sanches Silva**, pela atenção, ajuda, paciência e amizade com que conduziu a digitação desta Tese de Doutorado.

À **Lenyra Camillo Zamai**, funcionária aposentada do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pela atenção, amizade e ajuda.

A todos **Funcionários da Biblioteca**, pela educação, amizade, boa vontade, respeito e atendimento na ajuda ao desenvolvimento deste trabalho.

À funcionária da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, **Marisa Campos Polesi Placeres**, pela amizade e auxílio na execução deste trabalho.

À **Profa. Dra. Lizete Toledo de Oliveira Ramalho**, da Disciplina de Histologia, pela orientação segura e precisa quanto aos ensinamentos ao manuseio da Dignidade Humanitária.

Ao técnico **Luís Antonio Potenza**, da Disciplina de Histologia, pelos ensinamentos seguros para o tratamento e orientação dos animais que foram utilizados nessa pesquisa.

Aos **Amigos do Curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Ao **Luís Rocatelli**, pela amizade e paciência com que ajudou e orientou a parte fotográfica deste trabalho.

À **Danielle Cardoso Geraldo Maia**, aluna da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela grande contribuição quanto ao planejamento estatístico.

Aos meus Colegas do Curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, especialmente da área de Endodontia, **Ângelo Poliseli Neto, Fernando Simões Crisci, Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Maria Eugênia Flores Alatorre e Érica Sequeira.**

Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, **Marcos Vinícius Reis Só, Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, João Vicente Baroni Barbizan e Elaine Cristina Gulin de Oliveira**, com os quais convivi e muito aprendi em Endodontia, os meus agradecimento.

Sumário

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	15
PROPOSIÇÃO	101
MATERIAL E MÉTODO	102
RESULTADO	110
DISCUSSÃO	129
CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS	138
APÊNDICE	162
Resumo	170
<i>Abstract</i>	171

Introdução

O tratamento do Sistema de Canais Radiculares, desde o estabelecimento do correto Diagnóstico até à Proservação do caso constitui-se de atos operatórios interligados entre si, não podendo negligenciar-se qualquer dessas etapas, sendo a etapa operatória da obturação a que representa um reflexo dos predicados técnicos do profissional e, conseqüentemente, a comprovação do sucesso obtido em todas as etapas anteriores (Leonardo e Leal⁸², 1998).

De acordo com Bonetti Filho¹⁶, em 1986, a obturação e o material obturador recebem uma ênfase especial porque substituirão a polpa (tecido conjuntivo frouxo) radicular, e refletirão a postura do profissional em relação ao tratamento de canais radiculares.

O material obturador utilizado deve preencher requisitos adequados de propriedades Biológicas e Físico-Químicas, pois ficará em contato permanente com os tecidos apicais e periapicais, de forma que possa oferecer tolerância tecidual e selamento o mais "hermético" possível dos canais radiculares. Dessa forma, visando a obtenção de uma obturação hermética, e auxiliado por técnicas aprimoradas de obturação de canais radiculares, é necessário que materiais obturadores inseridos dentro do canal radicular na obturação, cumpram suas reais finalidades de selamento e respeito aos tecidos do ápice e periápice.

Os cones de guta-percha representativos da parte sólida, e os cimentos obturadores (parte plástica), tem como função, preencher todos os espaços vazios modelados anteriormente pela instrumentação, promovendo uma obturação tridimensional a mais hermética possível e combatendo os

microrganismos que escaparam da ação do preparo biomecânico e do curativo de demora. (Beltes et al.¹³, 1995; Leonardo⁸⁷, 1997).

Levando em consideração os mais variados aspectos de anatomia morfológica encontrada no terço apical dos dentes, esses materiais entram em contato direto com tecidos apicais e periapicais por um longo período, sendo que nesse momento, é de forma imperiosa a biocompatibilidade dos materiais obturadores (Bilginer et al.¹⁵, 1997; Leonardo⁸⁷, 1997; Kolokouris et al.⁷⁶, 1998). Assim, o selamento do forame apical pela deposição de tecido mineralizado ou fibroso no ápice, representa o isolamento desse material obturador (corpo estranho), do restante do organismo.

A partir dessa premissa, surgiram os cimentos obturadores à base de óxido de zinco e eugenol, resina epóxi, hidróxido de cálcio, tendo como exemplo de marcas comerciais, Kerr Pulp Canal Sealer, Topseal, Sealapex, AH Plus, Endométhasone e EndoFill^{2,22,39,46,86,99,105}.

A citotoxicidade desses cimentos obturadores, juntamente ou isoladamente de seus componentes, tem sido estudada "in vitro" (Gerosa et al.⁴⁶, 1995; Vajrabhaya et al.¹⁶², 1997) e "in vivo" (Pertot et al.¹¹³, 1992; Torabinejad et al.¹⁵⁶, 1995; Pertot et al.¹¹⁴, 1997; Rasquin¹²³, 1997). Levando-se em consideração que a legislação atual dificulta através das normas da Ética, o emprego de pesquisas "in vivo" (Garcés-Ortiz e Ledesma-Montes⁴³, 1997) e também as dificuldades inerentes a mesma, com grande número de variáveis, temos como opção a realização das pesquisas "in vitro"^{1,7,34,37,77,92,117,128,139,147,155,164}.

No estudo de células em meio de cultura ocorrem as condições necessárias para avaliar o metabolismo e comportamento celular,

em contato com diferentes materiais (Junqueira e Carneiro⁶⁴, 1997). A análise de células é opção para a reprodução das reações celulares ocorridas frente aos materiais obturadores, e tem como vantagem o controle sobre os fatores experimentais e número de variáveis, sendo sugerido que se deva conhecer o comportamento de um grupo de células, antes de se utilizá-lo como modelo de estudo (Arenholt-Bindslev e Bleeg⁶, 1990; Egea e Rubio-Manzanares³⁶, 1998).

Nas culturas de células, os cimentos obturadores ou os componentes que o constituem provocam alterações morfofuncionais possíveis de serem observadas e analisadas sob microscopia eletrônica ou óptica, com ou sem marcação celular com radioisótopos. As alterações da morfologia celular, evidenciam fenômenos intra e extracelulares de citotoxicidade partindo da instalação de processos degenerativos frente à exposição celular com material presente nos meios de cultura. As alterações morfofuncionais são indicativas de estimulação da capacidade funcional de síntese protéica, enzimática, presença de mediadores químicos de vital importância no processo reparatório reacional, fatores de crescimento celular, produtos do ácido araquidônico, citocinas e outras substâncias que desencadeiam situações ou alterações degenerativas como o peróxido de hidrogênio (Pick e Mizel¹¹⁶, 1981; Leonardo⁸⁷, 1997) e o óxido nítrico (Palmer et al.¹⁰⁶, 1987; Moncada et al.¹⁰⁰, 1991; Ialenti et al.⁶⁰, 1992; Teixeira et al.¹⁵⁴, 1993; Vespa et al.¹⁶³, 1994; Norris et al.¹⁰³, 1995).

No processo inflamatório, tamanho da lesão, tipo, capacidade dos cimentos de estimular a ação dos macrófagos e a liberação de mediadores químicos responsáveis nessas respostas, são alguns dos fatores a serem levados em consideração (Leonardo⁸⁷, 1997).

A agressão, oriunda do contato com os materiais obturadores ocasionam nas células, alterações morfofuncionais e até morte celular, sendo que a liberação de mediadores químicos nos ajuda a avaliar a citotoxicidade destes materiais (Leonardo⁸⁷, 1997), uma vez que quanto maior a liberação desses mediadores, maior é a agressão.

Dessa maneira a viabilidade celular através de um método quantitativo colorimétrico e a liberação da produção de reagentes intermediários de NO e H₂O₂, em cultura de macrófagos, através de diferentes metodologias, pode ser utilizada na avaliação da citotoxicidade de materiais obturadores (Pick e Keisari¹¹⁵, 1980; Pick e Mizel¹¹⁶, 1981; Mosmann¹⁰¹, 1983; Moncada et al.¹⁰⁰, 1991; Leonardo⁸⁷, 1997).

Revisão da literatura

Este capítulo revisa a literatura de forma sintética concernente à macrófagos, de algumas citocinas citadas nos trabalhos dos mesmos e reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, hidróxido de cálcio, e os cimentos obturadores de canal radicular derivados do hidróxido de cálcio, como o Sealapex, dos derivados do óxido de zinco e eugenol, Endofill e dos derivados da resina poliuretadas Polifil Ø.

Em 1964, Rappaport et al.¹²², utilizou dez materiais como cimentos obturadores de canais radiculares que foram avaliados experimentalmente. Estes materiais foram o óxido de zinco e eugenol, AH26, Diaket, Proco Sol radiopaco contendo prata, Proco Sol não contendo prata cimento de canal radicular, Kerr Sealer, Kloroperka, N₂, N₂ Medical e o Mynol, cimento obturador de canal radicular. Quatro métodos para testes foram utilizados: a) Estudo em modelo animal, onde dez cimentos endodônticos foram experimentados, no qual o tecido conjuntivo subcutâneo de rato, foi observado para resposta inflamatória, aos implantes dos materiais experimentados sendo examinados histologicamente; b) Estudo da citotoxicidade em cultura de células na qual diluições variáveis do material experimentado, foi colocado em cultura de células HeLa, examinadas microscópicamente, e o grau de citotoxicidade foi observado; c) Em um estudo bacteriológico foram experimentados dez cimentos endodônticos onde o grau de inibição de crescimento de microrganismos conhecidos, para os materiais testados, foram mensurados, sendo que foram usados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Klebsiella pneumoniae; d) Em um estudo usando modelo animal, quatro cimentos foram colocados no saco conjuntival do olho do coelho. Nesta estrutura foi então observado o grau de inflamação, por um período de 1 minuto, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e de 24 a 48 horas, onde os critérios usados foram arbitrariamente classificados como: muito irritante, irritante, suavemente irritante e não irritante. Os resultados mostraram que o AH26 promoveu a menor resposta inflamatória e o N₂ produziu uma resposta inflamatória severa em todos os métodos acima descritos.

Guess et al.⁵¹, em 1965, relataram que efeitos de membrana podem ser demonstrados pelo vermelho neutro, o qual é armazenado em células viáveis e liberado no meio circundante após dano celular.

Em 1966, Bauer et al.¹¹ analisaram as diferenças entre a capacidade fagocítica dos macrófagos de camundongos convencionais e axênicos (germ free) frente a inoculação de uma cepa de *Serratia marcescens*. Após realizarem testes histológicos e imunohistoquímicos, os autores observaram que a resposta celular nos animais axênicos era mais demorada e menos efetiva que nos animais convencionais, mostrando que a maior capacidade funcional dos macrófagos parece resultar da exposição contínua dos animais convencionais à estimulação antigênica da microbiota dos mesmos.

O estudo "*in vitro*" por meio de técnicas de cultura de células ou de tecidos, tem sido utilizado para pesquisar o efeito citotóxico de materiais

dentários, permitindo melhor controle das condições experimentais. Na área odontológica, estudos "*in vitro*" foram realizados por Kawahara et al.⁶⁶, 1968, que estudaram a citotoxicidade de vários materiais dentários, tais como, metais, ligas, resinas sintéticas, cimentos dentários, materiais obturadores de canal e materiais de capeamento pulpar com o auxílio do estudo em cultura de células. Para indicar a existência do dano celular podem ser utilizados, além da descrição da morfologia celular, diferentes evidências biológicas: efeitos de membrana, atividade celular e índice de proliferação.

Spängberg¹³⁷, 1969, introduziu o método de contagem de células e de mitose para avaliação do dano celular. O autor relata que existe algum grau de correlação entre a citotoxicidade inespecífica de um material "*in vitro*" e o efeito irritante do mesmo material "*in vivo*".

Spängberg¹³⁹, em 1973, introduziu o método da mensuração da liberação de um isótopo radioativo incorporado no interior das células (⁵¹Cr) para avaliação da citotoxicidade de um material baseado no dano celular após contato direto material-célula. Este método tem sido amplamente utilizado como teste de avaliação para muitos materiais dentários e provou ser útil para comparar a citotoxicidade de materiais obturadores endodônticos.

Pick e Keisari¹¹⁵, em 1980, preconizaram um método fotolorimétrico para análise da liberação do peróxido de hidrogênio obtido em cultura de macrófagos peritoneais de Porcos da Índia. O estudo baseou-se na oxidação do vermelho de fenol mediado pela peroxidase de raiz forte

(HRPO). Os macrófagos frente a estímulos de membrana, como por exemplo, partículas a serem ingeridas, liberam entre outros produtos o H_2O_2 . Neste trabalho, os autores utilizaram agentes estimuladores como Acetato de forbol mirístico (PMA), Zimosan, Concanavalina A (Con A), Aglutinina de germe de trigo (WGA), N-formil-metionil-leucifenilalanina (FMLP) e A 23187. O método mostrou-se eficiente e viável devido as características não tóxicas ou neutras do vermelho fenol e da HRPO.

Embora de valor limitado para testes de avaliação geral, a cultura de células pode ser um valioso instrumento na elucidação do mecanismo de biocompatibilidade de materiais dentários. A maioria dos materiais dentários tem uma composição química complexa e diferentes constituintes podem ser liberados dos materiais nas áreas circundantes. Ao investigar o mecanismo da resposta biológica a tais materiais é necessário, conforme Leirskar e Helgeland⁸¹, 1981, avaliar os efeitos biológicos das substâncias liberadas separadamente e em combinação, a interação destas com o meio biológico e os efeitos sinérgicos ou antagônicos das combinações desses constituintes. Aparentemente, um grupo de métodos é necessário para avaliar esses vários aspectos, uma vez que nenhum experimento isolado pode revelar a resposta biológica de materiais dentários.

Em 1981, Pick e Mizel¹¹⁶, desenvolveram dois ensaios para análise quantitativa da produção de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em culturas de macrófagos peritoneais de fêmeas de rato C57BL/6N e de Porcos da Índia. A avaliação da produção de O_2^- está baseada na redução

do ferricitocromo. A quantidade liberada de H_2O_2 é baseada na oxidação dependente de peroxidase de raiz forte (HRPO) do vermelho de fenol. Em culturas de macrófagos em placas de 96 orifícios, fundo chato para cultivo celular, foram adicionados 100 μ L de ferricitocromo ou vermelho fenol com HRPO. Após a adição de um agente desencadeador e estimulante da "explosão oxidativa" com incubação a 37°C por vários intervalos de tempo, as mudanças na absorbância do ferricitocromo e do vermelho fenol foram respectivamente medidas diretamente nas placas de cultura, utilizando-se um fotômetro automático. As principais vantagens deste método são as pequenas quantidades de células e reagentes utilizados, a sensibilidade e reprodutibilidade, o grande número de materiais que podem ser testados e especialmente a velocidade e conveniência oferecida pelo leitor automático. Quanto mais citotóxico é o material a ser fagocitado, maior energia é gasta pelo macrófago. A energia obtida através da explosão oxidativa, libera no meio o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , favorecendo a atividade microbiana do meio.

Stern et al.¹⁴⁴ (1981), determinaram por meio da técnica da imunoperoxidase, a proporção de células que compõem as lesões periapicais, que são produtoras de imunoglobulinas. Foram estudados 15 granulomas e 5 cistos periapicais humanos. Observaram que 42,0% dos linfócitos, os quais representaram 19,0% das células da lesão, foram imunoglobulinas positivas. IgG, IgA, IgE e IgM foram encontradas em 74,0%; 20,0%; 4,0% e 2,0% das células marcadas, respectivamente não foi observado nenhum padrão diferencial entre a distribuição ou produção das imunoglobulinas nos cistos e granulomas, quer seja nas lesões com ou sem história de dor; com presença ou

não de prévio tratamento endodôntico.

Os níveis de anticorpos circulantes contra bactérias aneróbias obrigatórias, em pacientes portadores de patologia pulpar e periapical, foi avaliada por Keudell et al.⁷⁰ (1982). Amostras bacteriológicas foram obtidas na primeira sessão, quanto também colheu-se sangue dos pacientes. Seis a nove meses após completar o tratamento endodôntico, novas amostras de sangue foram colhidas. A detecção de anticorpos foi realizada pela imunoeletroforese e os níveis de IgG e IgM foram detectados por imunodifusão. As bactérias predominantes foram bacilos gram-negativos anaeróbios, tais como *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Com relação aos níveis de IgG e IgM, não houve diferença estatística significativa entre os pacientes portadores de patologia pulpo-periapical e os pacientes normais. Todavia, atestaram significativos níveis de anticorpos na amostra sangüínea inicial, quando comparados aos pacientes normais. Não foi acusada diferença estatística significativa entre os níveis de anticorpos nos pacientes no momento do tratamento e 6 a 9 meses após sua conclusão.

Mosmann¹⁰¹ (1983), nos relata que o sal de tetrazólio (M.T.T.) tem sido usado para desenvolver um método quantitativo colorimétrico para a sobrevivência e proliferação das células dos mamíferos. O método detecta células vivas, e o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. Este método pode também ser usado para a mensuração da citotoxicidade, proliferação ou ativação das células. Os resultados podem ser lidos em um leitor de Elisa (espectrofotômetro) e demonstra um alto grau de precisão. As

principais vantagens do método colorimétrico, são sua rapidez, precisão, e o não uso de nenhum ou qualquer radioisótopo.

Holland e Souza⁵⁷, em 1985, visando testar a capacidade de um novo cimento obturador à base de hidróxido de cálcio (Sealapex) na indução da formação de tecido mineralizado, efetuaram estudo histológico utilizando 160 canais radiculares de 8 cães com 2 anos de idade e 80 canais radiculares de 4 macacos adultos. A remoção da polpa radicular foi realizada em dois diferentes níveis, 1 milímetro aquém do ápice radiográfico e ao nível do ápice radiográfico. Os canais foram obturados com cones de guta-percha e cimento Sealapex ou Kerr Pulp Canal Sealer, ou ainda pasta formada por hidróxido de cálcio e água destilada. Alguns canais radiculares foram mantidos vazios no grupo controle. Após um período de 180 dias, os resultados observados em dentes de cães e macacos foram semelhantes e mostraram que o Sealapex e a pasta de hidróxido de cálcio e água destilada induziram o fechamento apical pela deposição cementária. Este selamento foi mais freqüente nos casos em que a pulpectomia foi realizada 1mm aquém do ápice radiográfico. Nos casos em que ocorreu extravasamento do material, tanto o Sealapex como o Kerr Pulp Canal Sealer provocaram reação inflamatória crônica no ligamento periodontal. Porém, com o Sealapex, freqüentemente ocorreu a deposição de tecido osteóide na área do extravasamento ou, então, onde ele era reabsorvido. O grupo controle mostrou alguns casos de fechamento apical, sugerindo que ele poderia ocorrer sem o uso de materiais obturadores, desde que a assepsia fosse mantida durante todo o tratamento.

Schröder¹³⁰, em 1985, relatou que a resposta tecidual ao hidróxido de cálcio colocado sobre o tecido pulpar inicia-se por uma necrose superficial considerada leve, estimulando a defesa, seguida da proliferação vascular e da migração de células inflamatórias, células mesenquimais indiferenciadas e formação de colágeno. A seguir, ocorre diferenciação dos odontoblastos e forma-se o tecido mineralizado com aparência de dentina, normalizando a função pulpar. A mineralização do colágeno inicia-se com calcificações distróficas tanto na zona de necrose, como pela degeneração das células dos tecidos adjacentes, levando a deposição de minerais no colágeno recentemente formado. A presença de íons cálcio estimula a precipitação de carbonato de cálcio na área ferida contribuindo, possivelmente, para o processo de mineralização. A formação de tecido duro em contato com cimentos de hidróxido de cálcio indicou menor grau de agressão química inicial, quando comparada àquela produzida pelo hidróxido de cálcio puro. As diferentes respostas dos tecidos aos vários cimentos de hidróxido de cálcio podem estar relacionadas com fatores como: diferenças no pH e taxa de liberação de íons cálcio e hidroxila. Outros componentes dos cimentos induzem diferentes reações químicas que podem inativar o hidróxido de cálcio ou serem nocivos aos tecidos.

Perdigon et al.¹¹², em 1986, estudaram os efeitos da administração oral e intraperitoneal de *L. casei* e *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, na ativação de macrófagos. Eles utilizaram camundongos Swiss que receberam as bactérias por via oral por oito dias. Após esse período os macrófagos foram obtidos e avaliados quanto a sua atividade enzimática e

capacidade de fagocitose de carbono coloidal. Os resultados mostraram que a atividade enzimática dos macrófagos nos animais que receberam *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* por via intraperitoneal era dez vezes maior que o controle, na administração oral era cinco vezes maior. Já para o *L. casei*, essa atividade era três vezes maior nos animais que receberam via intraperitoneal e seis vezes maior por via oral. Nos testes de fagocitose, houve aumento em todos os animais tratados, porém os animais tratados com *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* mostraram os melhores resultados. Portanto, os autores sugeriram que a ingestão de lactobacilos pode representar uma via de estimulação não específica, podendo ser capaz de aumentar a resposta imune sistêmica ou modular as funções de células imunocompetentes.

Em 1986, Zmener e Cabrini¹⁶⁹, descreveram um método para avaliar os efeitos adversos de diferentes cimentos endodônticos sobre culturas celulares mistas de linfócitos e monócitos humanos. As células foram cultivadas em contato direto ou próximas a amostras experimentais, com os seguintes materiais: ionômero de vidro (ASPA), AH26, Diaket, Tubli-Seal e cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Fynal). Após a análise dos resultados obtidos, observou-se uma fraca citotoxicidade no grupo do cimento de ionômero de vidro, enquanto que os outros materiais puderam ser classificados, em ordem crescente de citotoxicidade, da seguinte maneira: AH26 > Diaket > Tubli-Seal > Fynal. De acordo com a análise estatística, foi significativa a diferença entre cada material e o grupo controle, assim como a diferença dos cimentos entre si.

Kawakami et al.⁶⁷, em 1987, estudaram os aspectos ultra-estruturais da calcificação inicial produzida por um cimento à base de hidróxido de cálcio (Vitapex). O cimento foi implantado em tecido subcutâneo no dorso e no abdômen de 39 ratos adultos, para avaliação microscópica em períodos de 4 a 129 dias. Nestes períodos observou-se a presença de calcificações heterotróficas que foi dividida em dois grupos: calcificação distrófica com matriz vesicular e calcificação semelhante a tecido ósseo. Os resultados sugerem ser esse um excelente material obturador de canais radiculares, capaz de induzir as células mesenquimais do ligamento periodontal a diferenciar-se em odontoblastos ou cementoblastos.

A liberação de óxido nítrico (NO) ocorrida pela atividade biológica, e a ação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), foi estudada por Palmer et al.¹⁰⁶, em 1987. Este estudo foi realizado em culturas de células, constituída da porção endotelial de células aórticas de coelhos ou células 3T3 e o NO foi determinado através do método de Quimioluminescência proveniente de sua reação com o ozônio. O relaxamento produzido pelo EDRF é indistinguível do produzido pelo NO. Os resultados sugeriram que o EDRF e o NO constituem a mesma molécula.

Yu e Stashenko¹⁶⁷ (1987), induziram lesão periapical em dentes molares de ratos e, nos intervalos de 15; 20; 30 e 90 dias, analisaram morfológicamente e imunohistoquimicamente as células presentes. Radiograficamente, as lesões estabilizaram no período de 15 a 30 dias; mas aumentaram significativamente entre 60 e 90 dias. Verificaram que o

componente celular inflamatório e imunológico, que somaram aproximadamente metade das células nucleadas, permaneceram constante durante todo o processo. Deste grupo de células, 50 a 60,0% foram linfócitos, com prevalência das células T, as quais superaram as células B e outras células Ia-positivas. Portanto, especularam que os linfócitos T desempenham importante função na patogênese periapical.

Zmener e Cabrini¹⁷⁰, em 1987, usando cultura de linfócitos e monócitos humanos, avaliaram os efeitos do CRCS, Sealapex e Dycal, interpretando os resultados por meio da adesão dessas células no material testado, assim como a variação na sua morfologia. Numa ordem crescente de efeitos adversos, observaram a seqüência Sealapex, CRCS e Dycal, considerando este último o menos compatível em razão do seu elevado pH, e o CRCS pelo fato de apresentar eugenol e eucaliptol em sua composição.

Leal et al.⁸⁰, em 1988, estudaram a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos CRCS, Sealapex, N-Rickert e Fill Canal. Os cimentos foram espatulados, colocados no interior de tubos de polietileno e implantados no tecido subcutâneo de um mesmo rato, em sistema de rodízio. Os períodos de observação foram de 7, 21 e 60 dias. De um modo geral, os materiais implantados mostraram-se irritantes, provocando reações inflamatórias de diferentes intensidades. Assim, no período inicial, o Sealapex e o N-Rickert exibiram uma reação tecidual moderada, enquanto com o CRCS e Fill Canal essa reação foi intensa. Na fase final, houve uma diminuição do processo inflamatório, onde os autores observaram, com o Sealapex, o CRCS e o N-

Rickert, discreta reação tecidual, enquanto que com o Fill Canal foi observada uma reação mais acentuada.

Meryon⁹³, em 1988, estudou a citotoxicidade em combinações do cimento óxido de zinco e eugenol (OZE), "*in vitro*", usando um sistema de modelo de cavidade, incorporando pedaços de dentina, e procurando avaliar fatores que afetam a liberação do eugenol, tais como: fonte do eugenol, presença e espessura de dentina e a presença do "*smear layer*" (camada residual). Os resultados mostraram que, na ausência de dentina, os diferentes compostos de OZE variaram amplamente quanto à liberação de eugenol e citotoxicidade, sendo todos os compostos testados altamente citotóxicos. Na presença de dentina, ocorreu considerável redução da liberação de eugenol e da toxicidade dos materiais estudados. Com o aumento da espessura da dentina, ocorreu a diminuição na liberação do eugenol. A remoção do *smear layer* da superfície da dentina reduziu o efeito protetor, tendo como consequência um aumento na liberação de eugenol.

Quanto ao preparo do material a ser experimentado, Spångberg e Pascon¹⁴⁰ (1988) atestaram que a maneira mais confiável consiste em prepará-lo exatamente como é utilizado clinicamente.

Em 1988, Tronstad et al.¹⁵⁷ avaliaram a solubilidade e a biocompatibilidade dos cimentos contendo hidróxido de cálcio, Sealapex e CRCS, de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol convencional e de uma pasta de hidróxido de cálcio e soro fisiológico, acondicionados em

cilindros de Teflon, posteriormente implantados em perfurações efetuadas no tecido ósseo da mandíbula de cães. Decorridos 90 dias, os animais foram sacrificados, os espécimes ósseos contendo os cilindros de Teflon removidos, incluídos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. Os resultados da análise histopatológica mostraram que, no grupo da pasta de hidróxido de cálcio e soro fisiológico, ela havia sido completamente solubilidade. Os cilindros foram preenchidos com tecido ósseo, não sendo observado processo inflamatório nos tecidos adjacentes. No grupo do cimento Sealapex, ele havia sido parcialmente solubilizado e, na maioria dos casos, substituído por tecido conjuntivo, com severa reação macrofágica e leve reação inflamatória. Em todos os casos analisados, o CRCS e o cimento de óxido de zinco e eugenol permaneceram nos cilindros, sem invaginação de tecido para o interior dos mesmos. Nenhuma reação macrofágica foi vista, porém severa reação inflamatória foi causada pelo CRCS, enquanto que reações inflamatórias suaves foram provocadas pelo cimento de óxido de zinco e eugenol.

Yesilsoy et al.¹⁶⁶, em 1988, avaliaram a citotoxicidade de vários cimentos obturadores de canais radiculares injetados em tecido subcutâneo de 12 porcos da Índia. Foram avaliados os cimentos de Grossman, Eucapercha, Endo Fill, CRCS, Sealapex e Hypocal, sendo utilizado, como controle uma solução salina estéril. Após um período experimental de 6, 15 e 80 dias, os animais foram sacrificados e as peças obtidas coradas pela hematoxilina e eosina e pelo método de Von Kossa. A análise histológica mostrou que o Sealapex e o Endo Fill apresentaram menor reação inflamatória do que

qualquer outro material testado. O cimento de Grossman, o CRCS e o Hypocal revelaram, predominantemente, reações inflamatórias severas em todos os períodos de tempo, exceto aos 80 dias. Calcificações difusas foram induzidas principalmente pelas preparações à base de hidróxido de cálcio, CRCS, Sealapex e Hypocal. Eucapercha e Endo Fill apresentaram reduzidas áreas localizadas de calcificação.

Arenholt-Bindslev e Horsted-Bindslev⁷, em 1989, estabeleceram um modelo *in vitro*, para verificar a citotoxicidade a longo prazo dos materiais obturadores AH26, CRCS, N2, Kloropercha NØ, OZE e dois cimentos experimentais (ECI e ECII). Tubos testes padronizados foram preenchidos com os cimentos recém espatulados e colocados em frascos com culturas de fibroblastos orais humanos. As mudanças na morfologia celular foram avaliadas após 15 dias da semeadura. O tamanho das zonas livres de células, em torno do tubo teste, e o número total de células por frascos de cultura fora, calculados após 5, 10 e 15 dias. De acordo com os resultados obtidos, o N2 foi o material mais citotóxico, em todos os períodos, enquanto que, nos tubos obturados com a Kloropercha NØ, não foram observadas reações tóxicas. Comparadas com o período de 5 dias de observação, algumas células foram recuperadas em torno dos tubos teste contendo AH26 e ECII, enquanto que uma recuperação celular quase total foi observada em torno dos tubos teste contendo CRCS, OZE e ECI. Os autores concluíram que este modelo, *in vitro*, pode ser utilizado para testar a toxicidade inicial dos materiais odontológicos.

Matsumoto et al.⁹², em 1989, compararam a citotoxicidade de novos cimentos que não continham eugenol na fórmula (New A, New B e New B-2), com cimentos endodônticos convencionais (AH26, Diaket, Canals, Tubli-Seal e Sealapex). Foram usadas células da polpa dentária de 6 ratos Wistar obtidas através de cultura primária de células. Os cimentos foram analisados logo após a manipulação. Foi incorporada Timidina tritiada no DNA celular. Nos experimentos com cimentos já endurecidos, as mudanças de morfologia celular foram analisadas por microscópio de fase. Os resultados mostraram que os cimentos New A, New B e New B-2 recém manipulados, mostraram toxicidade mínima na síntese de DNA. O Sealapex foi pouco inibidor também. Houve inibição da síntese de DNA nos cimentos Tubli Seal e Canals; nos cimentos AH26 e Diaket, ocorreu inibição quase que total da síntese de DNA e endurecimento, o cimento New B não alterou a morfologia celular, o Diaket causou deformação na forma dos núcleos. Estes autores constataram "*in vitro*", que os novos cimentos, sem eugenol, são menos tóxicos em comparação aos cimentos endodônticos convencionais. Aqueles cimentos à base de resina foram os mais tóxicos. A toxicidade aumentou na seguinte ordem: New B, New B-2, New A, Sealapex, Canals, Tubli Seal, AH26 e Diaket no grupo dos recém manipulados; e New B, New A, Diaket, Canals, AH26, Tubli Seal e Sealapex no outro grupo.

Tagger e Tagger¹⁴⁵, em 1989, efetuaram estudo histológico em dentes de macacos, com o objetivo de avaliar, a longo prazo, a resposta dos tecidos periapicais aos cimentos que contém hidróxido de cálcio, CRCS e Sealapex, comparados ao cimento AH26. Foram empregados incisivos e

segundos pré-molares inferiores, os quais tiveram seus canais radiculares instrumentados e obturados com cones de guta-percha, e os cimentos em estudo. Os animais foram sacrificados após um período de 7, 8 e 14 meses. Os resultados histológicos mostraram uma resposta inflamatória moderada a severa na região periapical das raízes obturadas com AH26 e CRCS. A maior parte dos espécimes relativos ao Sealapex não apresentou células inflamatórias, exceto macrófagos com partículas do cimento obturador. Ainda com relação ao Sealapex, foi observada uma tendência à obliteração apical por tecido calcificado, aparentemente após a reabsorção do material obturador. Os autores ressaltaram que, apesar dos bons resultados obtidos com o Sealapex, tornam-se necessárias pesquisas adicionais, com o fim de experimentar o material em canais infectados. Sugeriram, ainda, que a capacidade do cimento de ser reabsorvido, era uma vantagem quando de sua substituição por tecido calcificado, sendo uma desvantagem a sua não reabsorção.

Bonetti Filho¹⁷, em 1990, avaliou a biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares: 1) clássica (Fill Canal), 2) biológica controlada (Fill Canal), 3) com colocação apical de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e 4) clássica (Sealapex). Utilizou 82 canais de 5 cães. Um alargador de nº 20 foi introduzido no canal radicular até atingir o batente apical e foi iniciado o processo de arrombamento, com um alargador nº 30, e o limite da perfuração foi de 2mm além do comprimento inicial estabelecido. A instrumentação foi realizada no batente apical, com alargadores e limas Hedströen até o nº 60. Os canais foram secos com pontas de papel absorventes e obturados com cones de guta-percha principais e auxiliares, de

acordo com as quatro técnicas mencionadas. Todas as câmaras pulpares foram fechadas com amálgama. Dez canais foram instrumentados, mas não obturados, para servirem de grupo controle. Após 180 dias, os cães foram mortos, as peças descalficadas, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica. As análises dos resultados, através da biocompatibilidade, permitiram a seguinte classificação, de acordo com o grau de sucesso: 1ª) Técnica clássica (Sealapex), 2ª) Colocação apical de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e Técnica biológica controlada (Fill Canal), 3ª) Técnica clássica (Fill Canal) e 4ª) Grupo controle.

Freshney⁴¹, em 1990, relata que os ensaios com cultura de células podem ser dividido em duas classes: (1) Resposta imediata ou a curto prazo, tal como alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica; e, (2) Sobrevivência a longo prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto-renovação ou sobrevivência em estado alterado, como por exemplo, transformação maligna. Os ensaios de curta duração são usados para medir a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria dos testes de viabilidade baseia-se no rompimento da integridade da membrana, determinado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (por exemplo, azul de Trypan, eritrosina ou nigrosina), ou a liberação de um corante ou isótopo normalmente retido pelas células viáveis (por exemplo, diacetato de fluoresceína ou cromo radioativo). Testes a longo prazo geralmente são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo é medir a sobrevivência. A capacidade de

sobrevivência das células a uma injúria tóxica tem sido a base da maioria dos testes de citotoxicidade, uma vez que a sobrevivência implica na retenção da capacidade regenerativa da célula.

McFarlane et al.⁸⁸, em 1990, estudaram a liberação de IL-1 β e TNF- α pela cultura de células mononucleares em pacientes com periodontite. Monócitos não estimulados de pacientes com periodontite liberaram mais IL-1 β do que pacientes controle durante as primeiras 24 horas de cultura: havendo uma ampla variação na quantidade de IL-1 β liberada (0,45-13,00ng/mL x 10⁶ céls), a qual não foi relacionada com o grau do osso perdido na bolsa periodontal. Quando estimulados com LPS, os monócitos produziram mais IL-1 β do que os pacientes controle. O TNF- α foi detectado em culturas de periodontite (0-76ng/mL x 10⁶ céls), mas este valor não foi significativamente diferente do encontrado no grupo controle. Já o TNF- α estimulado por LPS, era significativamente maior. Embora o papel preciso da IL-1 β e do TNF- α nas periodontites continuem incertos, estes dados acima relacionados indicam que ambas as citocinas podem participar da patogênese da doença periodontal.

Meryon e Brook⁹⁴, em 1990, avaliaram a citotoxicidade de materiais endodônticos. Compararam, por meio de uma nova técnica, *in vitro*, os seguintes materiais: AH26 com prata, AH26 sem prata, Biocallex, Diaket, Endomethasone, Forfenan, Kerr Pulp Canal Sealer, Kloropercha, Kripaste, Sealapex, Spad e Tubli-Seal. O modelo experimental constituiu em um pirex cilíndrico, simulando o canal radicular, unindo a uma tampa de placa de Petri. Um filtro permeável foi colocado na base do cilindro, em contato com 2mL de

meio de cultura coberto com uma monocamada de fibroblastos BHK-21 (C-13), representando as células do ligamento periodontal. As placas foram semeadas com 4×10^5 células e, após incubação por 24 horas a 37°C, com tensão de 5% de CO₂, as tampas montadas contendo os materiais a serem testados, foram colocadas sobre os materiais teste, acima do filtro permeável, simulando o tampão apical de dentina. O primeiro grupo de 5 materiais foi testado em quadruplicata, sem dentina, e o experimento repetido por 3 vezes, sendo, a seguir, testado na presença de 0,5mm de dentina. O segundo grupo de 7 materiais foi avaliado de forma similar, embora 4 deles tenham sido também testados na presença de 1mm de dentina. Após exposição por 24 horas, os sobrenadantes foram removidos, as células lavadas 2 vezes, e após tripnização, elas foram contadas usando um contador eletrônico Coulter. No primeiro experimento, uma placa de cada material foi corada com 0,05% de azul tripã, para determinar a viabilidade celular previamente à tripnização. Os resultados demonstraram que, na ausência de dentina, a Kloropercha, Biocalex, Diaket e Endomethasone foram levemente citotóxicos. O AH26 com e sem prata, Sealapex, Tubli-Seal e Kerr Pulp Canal Sealer, foram moderadamente tóxicos, enquanto o Forfenam, Spad e Kripaste foram intensamente citotóxicos. Na presença de dentina, a citotoxicidade destes materiais foi consideravelmente reduzida, com exceção do Endomethasone, Forfenam, Spad e Kripaste. Embora os testes de implantação, para verificar a citotoxicidade de materiais, sejam os mais vastamente utilizados, o método descrito, neste trabalho, é uma alternativa satisfatória, econômica, reproduzível, onde a dentina pode ser incorporada.

Segundo Pollard¹¹⁹ (1990) a determinação do número celular poderia ser realizada usando um contador de partículas eletrônico ou por um hemocitômetro. O primeiro é mais preciso e pode ser usado para contar baixas concentrações de células (aproximadamente 10^3 células/mL). O segundo, requer maior densidade e é mais propenso à amostragem de erro. No entanto, permite uma estimativa visual do estado das células e, combinado com a exclusão do corante azul de Trypan, pode ser usado para estimar a viabilidade celular. Para a contagem, as células são ressuspendidas e uma gota da suspensão celular é adicionada aos dois lados do hemocitômetro. Cada quadrado fornece uma área de 1 mm^2 e uma profundidade de $0,1 \text{ mm}$, isto é, o volume de 10^{-4} mL . Para determinar a viabilidade celular, antes de colocar as células no hemocitômetro, elas podem ser diluídas em azul de Trypan. O número de células que não se coraram, ou seja, que apresentaram a membrana intacta, pode ser assim determinado.

Soares et al.¹³⁶, em 1990, analisaram a resposta dos tecidos periapicais e cimentos obturadores de canais radiculares que contém hidróxido de cálcio. Testaram os cimentos Sealapex e CRCS, utilizando 120 canais radiculares de dentes de cães. Após a instrumentação dos canais radiculares, estes foram divididos em três grupos e obturados pela técnica da condensação lateral ativa, com cones de guta-percha e cimento CRCS, Sealapex e óxido de zinco e eugenol, este usado como controle. Decorridos 30 e 180 dias, os animais foram sacrificados e as peças obtidas foram submetidas ao processamento histológico. Os cimentos Sealapex e CRCS causaram resposta tecidual periapical semelhante à encontrada com o cimento de óxido de zinco e

eugenol, com resposta mais acentuada nos espécimes em que ocorreu extravasamento de material obturador. Nos casos em que o material obturador estava presente no "batente apical", constatou-se invaginação de tecido conjuntivo com células inflamatórias crônicas. A deposição de tecido duro com fechamento parcial da abertura apical foi observada para os três cimentos estudados. Nos grupos do Sealapex e CRCS, partículas de cimento foram vistas distantes do ápice. Todos os casos de extravasamento levaram à reação inflamatória crônica dos tecidos apicais.

Analisando as possíveis vias que ligam a infecção do canal radicular ao processo de reabsorção osteoclástica, Stashenko¹⁴¹ (1990) relata que estas células possuem componentes desmineralizadores e enzimas proteolíticas, tais como fosfatase ácida tartrato resistente, a qual é um marcador fenotípico particular, e tais células originam-se da mesma linhagem progenitora dos macrófagos. A proliferação e fusão das células osteoclásticas é ativada pela IL-1, TNF- α e β , TPH, e inibida pelo TGF- β e calcitonina. Entendem os autores que os osteoclastos não reabsorvem osso na ausência de osteoblastos funcionais, pela necessidade do fator solúvel de baixo peso molecular "X". Contudo, no processo de remodelamento fisiológico do tecido ósseo - "Turnover" - os osteoblastos parecem ser influenciados por citocinas liberadas pelos osteoclastos. Nos processos inflamatórios crônicos, tais como nas lesões periapicais, passa a predominar o processo de reabsorção, baseado no fato de que a formação óssea é notavelmente mais sensível à presença de citocinas. Neste particular, destaca-se a IL1- β , como principal responsável pelo desacoplamento da atividade osteogênica periapical.

Takahara et al.¹⁴⁷, em 1990, avaliaram nos períodos de 24 a 48 horas, a citotoxicidade dos cimentos New A, New B-1, New B-5 e New B-6 (contendo ácidos graxos em substituição ao eugenol), Tubliseal, Diaket A, AH26, Canals e Sealapex, recém espatulados. Os cimentos foram acondicionados em tubos de polietileno e colocados em contato com culturas de células de tecido ósseo de ratos Wistar, sendo a citotoxicidade avaliada por meio de alguns parâmetros: medida de incorporação de timidina radioativa, medida da atividade de fosfatase alcalina, medida da síntese de DNA, medida da quantidade de proteína, observação da morfologia celular e medida da liberação de cálcio. Como controle foram utilizados tubos de polietileno vazios. Os autores constataram que a síntese de DNA foi inibida frente a todos os cimentos estudados. A inibição da atividade da fosfatase alcalina nas células expostas aos cimentos Diaket A, AH26, Canals e Tubliseal ocorreu intensamente nos dois períodos experimentais, sendo inibida, em menor grau, no Sealapex. Os novos cimentos testados (New B-1, New B-5, New B-6 e New A) apresentaram resultados semelhantes aos do controle. Todos os cimentos induziram alterações morfológicas sobre as células, diminuindo a densidade celular. As menores alterações foram observadas com os cimentos New B-6 e New A. A maior liberação de íons cálcio, nos dois períodos experimentais, foram observados nos cimentos New B-1 e New B-5, sendo que, no Sealapex, essa liberação foi semelhante à encontrada no grupo controle. Os autores concluíram que os cimentos New A, New B-1, New B-5 e New B-6, apresentaram, nesse experimento, menor citotoxicidade *in vitro* que os cimentos comercialmente disponíveis.

Trowbridge¹⁵⁸ (1990), relata que a persistência do processo inflamatório crônico, resulta em destruição do parênquima periapical, sendo esse processo medeado por células acessórias, macrófagos e linfócitos, as quais se comunicam por meio de citocinas. A inflamação crônica pode ser mantida por agentes infecciosos, componentes bacterianos, remanescentes de microrganismos mortos, corpos estranhos e produtos de metabolismo bacteriano. As alterações teciduais associadas à inflamação crônica podem ser reversíveis ou não. Se as células destruídas tem a capacidade de regenerar, o tecido pode reconstituir-se à originalidade, desde que a infra-estrutura reticular seja preservada e o fator agressor completamente eliminado. A persistência do fator estranho local determina uma reação tecidual denominada "reparo frustado". As reações periapicais crônicas apresentam um componente tecidual granulomatoso. A remoção do fator agressivo local, permite a evolução deste tecido para uma forma de granulação, onde o número e a distribuição dos macrófagos e linfócitos tornam-se reduzidas, com concomitante proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos, passando a predominar os processos regenerativos ou cicatriciais na região lesada.

O conceito de biocompatibilidade está mudando. Durante muito tempo considerou-se tradicionalmente biocompatibilidade como sendo a falta de interação significativa entre contato material/tecidos. Hoje, sabe-se que muitos materiais são compatíveis quando introduzidos em um determinado local do organismo, mas respondem de uma maneira diferente em outros locais. Os materiais restauradores dentários constituem um bom exemplo desta dependência de local. Uma definição mais apropriada de biocompatibilidade

seria a capacidade de um material reagir apropriadamente com a resposta do hospedeiro numa aplicação específica (Williams¹⁶⁵, 1990).

Zmener et al.¹⁷¹, em 1990, analisaram a resposta tecidual de um cimento experimental com hidróxido de cálcio após implante em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. O material em estudo constituiu do Sealapex sem dióxido de titânio, retirado de sua fórmula original em função da provável relação de sua presença com a reação de corpo estranho causada pelo cimento. O material foi colocado em tudos de silicone e implantado no tecido subcutâneo de 30 ratos. Os animais foram sacrificados após 7, 30 e 90 dias para a análise histométrica e quantitativa. O exame microscópico demonstrou diferentes graus de alteração dos tecidos ao material testado. Tecido granulomatoso contendo numerosas células gigantes do tipo corpo estranho e macrófagos contendo partículas em seu citoplasma foram detectados em contato com o material experimental. Fibroblastos e vasos recém formados também foram observados. Estas reações aumentaram, progressivamente, aos 30 e 90 dias de observação.

Gulati et al.⁵³, em 1991, estudaram a resposta tecidual frente a dois cimentos endodônticos à base de óxido de zinco. Os materiais testados foram o óxido de zinco associado ao eugenol ou à glicerina. Os cimentos, após espatulados, foram injetados subcutaneamente em ratos. A resposta tecidual foi analisada pela contagem de células polimorfonucleares nos períodos de 1, 7 e 15 dias. Os resultados demonstraram que a toxicidade foi maior para os cimentos que continham eugenol e que era diminuída com o decorrer dos três

períodos estudados. Para o cimento sem eugenol, a resposta tecidual foi mais suave, atingindo um pico aos 7 dias e diminuindo após este período.

Mangan et al.⁸⁹, em 1991, observaram que o LPS, TNF- α e IL-1 β impediram a apoptose de monócitos humanos. Os resultados deste trabalho indicaram claramente que os monócitos morrem por apoptose quando cultivados sem estimulação. Quando adicionaram LPS da *Escherichia coli*, que é um potente ativador de monócitos, mesmo em concentrações baixas causaram um aumento na sobrevivência dos monócitos. O mesmo foi observado para a IL-1 β e TNF- α , sugerindo que a apoptose é regulada por certas citocinas. A regulação da apoptose pode ser um importante mecanismo homeostático para controlar o número de monócitos capazes de responder à infecção, cura da ferida e crescimento tumoral.

Uma revisão sobre o óxido nítrico (NO) abordando seus aspectos fisiológicos, patofisiológicos e farmacológicos foi realizada por Moncada et al.¹⁰⁰, em 1991. A liberação fisiológica de NO depende da estimulação de uma enzima cálcio dependente a L-arginina. A enzima responsável pela catalização da conversão da L-arginina e oxigênio molecular a L-citrulina, e do NO é a NO sintase (NOS). Sua liberação pode ser inibida pela L-canavanina, L-NMMA (NS-monometil-L-arginina), L-NIO (N-iminoetil-L-ornitina), L-NAME (N⁶-nitro-L-arginina-metil-éster). O NO tem ações farmacológicas como relaxante vascular, inibidor da agregação plaquetária e citoprotetor. Pode ser liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano. A ativação macrofágica frente a L-arginina produz a síntese de

L-citrulina e NO_2^- e a presença de L-NMMA previne a síntese destes produtos que tem expressão citotóxica. O LPS, assim como o $\text{IFN-}\gamma$ são ativadores macrofágicos. A produção de NO, que é um gás solúvel de radical livre, ocorre também nos neutrófilos, células endoteliais e neurônios centrais específicos. L-NAME um potente inibidor da síntese endotelial de NO, não tem ação neutrofílica, e a estimulação para a síntese ocorre frente ao leucotrieno B4 e FMLP. O NO (óxido nítrico) é liberado pelo contato dos macrófagos com o material obturador, através da excitação de membrana celular. Ele é formado através da reação catalizada por enzimas entre o oxigênio molecular e a L-arginina. Mais especificamente, ele se combina ao heme e a outros grupamentos de feno-enxofre, importantes para atividades biológicas como granilato-ciclase. Assim como o H_2O_2 e o TNF, quanto mais liberado no meio, é indicativo de maior citotoxicidade do material em contato. Desta feita, a mensuração da produção de reagentes intermediários de NO e H_2O_2 e do TNF- α , em cultura de macrófagos, foi utilizada na avaliação da citotoxicidade de diferentes materiais obturadores, nesse caso específico, cimentos endodônticos já citados anteriormente.

Pissiotis e Spangberg¹¹⁸, em 1991, avaliaram a citotoxicidade de um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol (Pulpispad) frente a fibroblastos do ligamento periodontal da gengiva, de polpa humana e de células L929 (fibroblastos de adenocarcinoma murino). O material era incubado nas células por 4 e 24 horas e a toxicidade era avaliada pelo método de liberação de cromo radioativo (^{51}Cr). As células utilizadas nesta investigação mostraram graus diferentes de sensibilidade. As células L929

foram as mais sensíveis. O Pulpispad mostrou ser um material endodôntico tóxico ao ser avaliado pelo método do ^{51}Cr , permanecendo tóxico em todos os períodos de estudo.

Rocha¹²⁵ (1991), considera que a proliferação epitelial a partir dos restos epiteliais de Malassez, provavelmente deve-se a uma falha circunstancial do sistema de vigilância imunológico, que não reconheceria células proliferantes, supostamente portando proteínas antigênicas, em virtude da excessiva penetração antigênica oriunda do canal radicular. Logo, a eliminação da fonte antigênica exuberante, mediante a limpeza e obturação do canal radicular, possibilitaria o reconhecimento imunológico do revestimento epitelial. Neste sentido, a autora verificou imunocitoquimicamente, a existência de um padrão morfológico microscópico próprio para as lesões periapicais. Nos dentes tratados endodonticamente, os linfócitos T e células de Langerhans estavam em alta densidade, tanto no revestimento epitelial como na parede fibrosa, havendo pouco ou nenhum epitélio preservado, enquanto a presença de linfócitos B foi consideravelmente menor em relação aos incipientes, as quais por sua vez, estavam praticamente ausentes nos cistos residuais. Portanto, estes fatos histopatológicos sugerem que o tratamento endodôntico propicia condições para que as reações inflamatórias e imunológicas atuem na resolução não cirúrgica dos cistos periodontais apicais.

Leonardo⁸⁶, em 1992, avaliou microscopicamente, em dentes de cães, a reação dos tecidos apicais e periapicais, após a obturação dos canais radiculares com dois cimentos à base de hidróxido de cálcio, Sealapex

e CRCS. Foram utilizadas no trabalho 16 raízes de pré-molares inferiores de 2 cães sem raça definida, com idade aproximada de 1 ano. Após o arrombamento do delta apical, os canais radiculares foram instrumentados no comprimento do início do delta apical e obturados com cones de guta-percha e um dos dois cimentos em estudo. Decorrido o período experimental de um ano, os animais foram sacrificados e as peças obtidas preparadas para o exame microscópico. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os cimentos, Sealapex e CRCS, causaram uma inflamação crônica, de magnitude moderada, e induziram a deposição de tecido mineralizado na região apical. No grupo obturado com cimento Sealapex observou-se uma interposição de tecido fibroso entre o material e o tecido mineralizado. No grupo do CRCS, a deposição de tecido mineralizado ocorreu diretamente na sua superfície. Desta forma, o CRCS pareceu ter se comportado biologicamente melhor que o Sealapex, porém, sem diferença estatisticamente significativa.

Molloy et al.⁹⁸, em 1992, avaliaram a tolerância tecidual de dois cimentos endodônticos resinosos experimentais, um deles acrescido de prata, por meio de estudo comparativo com outros quatro cimentos: Sealapex, Kerr, AH26 e cimento de Roth. Cada cimento, após manipulação, era levado ao interior de tubos de polietileno, que eram implantados no tecido subcutâneo de ratos Sprague-Dawley. Decorridos os períodos de 3, 10, 20, 30 e 60 dias, os animais eram sacrificados e as peças obtidas preparadas para o exame histológico. A análise dos resultados mostrou que todos os cimentos demonstraram inicialmente inflamação suave, que cessou rapidamente. Em todos os tempos estudados, não ocorreu diferença entre os cimentos, exceto

para o AH26, que manteve algum edema até o período de 30 dias. Aos 60 dias, todos os materiais se mostravam compatíveis entre si.

De acordo com Perala et al.¹⁰⁹, em 1992, a IL-1 é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos, a qual provavelmente atua mediando alterações imunológicas e endócrinas, associadas à infecção microbiana, agressão tecidual, processo inflamatórios e reabsorções ósseas. Os estímulos para produção de IL-1, incluem microrganismos, LPS, complexo antígeno-anticorpo, corpos estranhos e outras citocinas. O propósito deste estudo foi analisar implantes dentários na estimulação de células mononucleares a produzirem IL-1 β (também conhecida como fator ativador de osteoclastos) e TNF- α , uma vez que, a produção destas citocinas pode levar à perda óssea e conseqüentemente à perda do implante. Os implantes foram incubados em culturas de células mononucleares (macrófagos) e a liberação de citocinas medida por técnica de radioimunoensaio. Todos os cinco diferentes tipos de implantes (IMZ) recoberto com hidroxiapatita, IMZ de titânio, Osseodent de titânio, Osseotite recoberto com hidroxiapatita, e Swedevent de titânio) induziram a liberação de IL-1 β e TNF- α , sendo os implantes revestidos com hidroxiapatita os que apresentaram maior liberação.

Nas lesões periapicais induzidas em ratos, o período de zero a 15 dias é considerado a fase ativa de expansão da lesão, caracterizada pela marcante destruição óssea e, a partir de então, tem-se a fase estacionária ou crônica, que se estende dos 20 aos 30 dias. Baseado neste modelo experimental, Stashenko et al.¹⁴² (1992), verificaram através de análise

fenotípica, que durante a fase ativa da lesão, os linfócitos T auxiliares superaram os linfócitos T supressores, numa relação de 1,7, proporção similar à encontrada na circulação sanguínea; contudo, aos 20 e 30 dias, esta relação declinou para 0,9 e 0,7, respectivamente, ou seja aumentaram o número de células T supressoras exatamente na fase crônica da lesão periapical. Avaliando a atividade reabsorvedora óssea, pela mensuração da liberação de ^{45}Ca radioativo administrado durante o período fetal, observaram que o comportamento temporal osteolítico foi aproximadamente idêntico num grupo que recebeu polimixina B ($1\mu\text{g/mL}$), um bloqueador do lipopolissacarídeo. Entretanto, o tratamento com uma proteinase-K ($50\mu\text{g/mL}$) por 1 hora a 37°C , ou aquecimento a 70°C por 30 minutos, aboliu por completo a atividade reabsorvedora óssea. Estes dados sugerem que as endotoxinas não são os responsáveis diretos pela reabsorção óssea em ratos. Ademais, a caracterização das moléculas nos estágios de atividade da lesão, revelou que as mesmas apresentaram peso molecular compatíveis com os das citocinas, especialmente a $\text{IL-1}\alpha$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$, ficando 10 a 15% da osteólise exercido pela PGE_2 .

Fundamentados na assertiva de que a fosfatase ácida tartrato resistente é o marcador enzimático das células osteoclásticas e a fosfatase alcalina óssea o é da série osteoblástica; Anan et al.³ (1993) avaliaram histoquimicamente, em secções histológicas incluídas em parafina, o processo de evolução das lesões periapicais, em molares de ratos que sofreram extirpação pulpar seguido de contaminação. Previamente, aos 2 e 3 dias, notaram no ligamento periodontal e no osso alveolar, aumento da atividade

para fosfatase ácida tartrato-resistente e redução a partir do 7º dia. Quadro oposto foi observado para a atividade fosfatase alcalina. Observaram, simultaneamente, aumento de osteoclastos e de lacunas de Howship, em número e tamanho. Além disso, um número de células mononucleares fosfatase ácida tartrato resistente foi observado nas proximidades dos osteoclastos, as quais pareciam pré-osteoclastos, previamente ativados. Acredita-se que os pré-osteoclastos originam-se de células mononucleares da medula óssea e migram, via corrente vascular, para as superfícies ósseas a serem reabsorvidas.

Araki et al.⁵, em 1993, avaliaram microscopicamente a citotoxicidade de dois cimentos endodônticos à base de óxido de zinco. Os cimentos foram divididos em 3 grupos experimentais: recém-manipulados, 24 e 168 horas após a espatulação. A composição do pó era igual nos dois grupos, alterando-se apenas a parte líquida. Em um dos grupos foi utilizado o eugenol, e no outro ácido graxo. As amostras foram incubadas por 4 e 24 horas em contato direto e indireto com células L929. A toxicidade foi avaliada usando-se leitura de liberação de ⁵¹Cr. Em contato direto, os cimentos foram citotóxicos quando recém manipulados ou após 24 horas. Após uma semana, o cimento à base de eugenol ainda mostrava-se tóxico, enquanto que, no cimento à base de ácido graxo, não houve diferença significativa do grupo controle em relação ao grupo de 4 horas após o seu preparo. No contato indireto, os materiais mostraram pouca citotoxicidade, somente o cimento à base de óxido de zinco e eugenol recém preparado foi claramente citotóxico após 24 horas.

Barbosa et al.⁹, em 1993, salientando a importância da biocompatibilidade dos cimentos obturadores de canais radiculares no sucesso do tratamento endodôntico, analisaram a pasta FS e os cimentos N-Rickert, Fill Canal e Sealer 26 através de um método de análise do ⁵¹Cr liberado em meio de cultura de células. As células de camundongos L929 e fibroblastos do ligamento periodontal foram usadas como células marcadas. Os cimentos, recém manipulados foram colocados direta e indiretamente sobre as células, sendo feita a análise da citotoxicidade durante o endurecimento do cimento e após 1, 7 e 14 dias. Os autores concluíram que, dos quatro cimentos acima descritos, o Sealer 26 foi o que apresentou menor toxicidade durante a reação de endurecimento. Após 24 horas, o Sealer 26 e a pasta FS apresentaram resultados melhores que o Fill Canal e o N-Rickert. No período de 7 dias, a maior toxicidade foi observada no cimento Fill Canal.

Hetem et al.⁵⁶, em 1993, avaliaram a biocompatibilidade, *in vitro*, dos cimentos Sealapex, AH26, CRCS e óxido de zinco e eugenol, em germes dentários de molares de camundongos albinos, com 14 ou 17 dias, empregando três diferentes metodologias. Os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e condensados em um molde de silicone, em forma de disco. Em seguida, os discos de cada cimento foram testados de três maneiras diferentes: 1ª) os discos, após o período de presa, foram colocados no meio de cultura, no qual os germes foram cultivados; 2ª) os discos foram colocados em placas de Petri, contendo meio de cultura, e utilizados após um período médio de 15 dias de incubação em estufa; 3ª) os germes dentários foram cultivados no líquido onde os discos ficaram

depositados durante 15 dias. Decorridos 6 dias, os germes foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados com 6µm de espessura e corados pelo método de hematoxilina e eosina, para análise em microscopia ótica. De acordo com os resultados obtidos, todos os cimentos analisados mostraram-se incompatíveis com o desenvolvimento dos germes dentários, nas condições de experimentação. Os germes dentários, obtidos dos animais mais jovens, foram mais resistentes que os obtidos dos animais mais velhos. O meio de cultura onde os discos dos cimentos ficaram depositados, apresentou melhores resultados, com relação aos demais experimentos, sugerindo que a liberação de substâncias tóxicas é constante na presença dos discos, e que as mesmas se dissipam quando são ausentes.

Em 1993, Teixeira et al.¹⁵⁴, estudaram o papel das prostaglandinas e do óxido nítrico (NO) na reação inflamatória aguda em tecido intradérmico de Porcos da Índia. A administração de um inibidor da síntese de NO, N^o-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) dependendo da dose, inibiu a formação de edema, que foi induzido em resposta a injeção intradérmica de bradicinina. A inibição através da L-NAME da indução da formação de edema pela bradicinina, é o efeito oposto, a injeção de nitroprussida de sódio (SNP) ou prostaglandina E1 (PGE1). Os resultados mostraram que a inibição da produção de NO reduz o acúmulo de leucócitos e a formação de edema, podendo ser induzida através de diferentes mediadores da inflamação. A administração de L-NAME também causou a diminuição local do aporte sangüíneo. Os autores sugeriram que é este o mecanismo que exerce efeito antiinflamatório neste modelo.

Araki et al.⁴, em 1994, avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos obturadores de canais radiculares. Os componentes do pó, ambos seladores, principalmente o zinco, foram os mesmos. O líquido de um cimento, o Canals, foi óleo de cravo (com mais de 89% de eugenol), e de Canals-N, na maioria ácidos e glicol. Utilizaram células L929 e fibroblastos do ligamento periodontal humano. A citotoxicidade foi avaliada usando o método radiocromo com quatro tempos de exposição. Misturas frescas de Canals foi amplamente tóxica ($p < 0,01$) para as duas células. Após 24 horas a toxicidade foi detectada. Em nenhum período foi observada toxicidade com o cimento Canals-N. Estes resultados indicaram que ambos os materiais tiveram um baixo conteúdo de água difundindo com o componente tóxico. A substituição do eugenol poderia favorecer uma diminuição na toxicidade do cimento.

Berbert e Consolaro¹⁴, em 1994, avaliaram a influência de cimentos endodônticos na migração de polimorfonucleares neutrófilos, utilizando o teste "Skin Window". Gotículas de cimento recém manipulados foram levadas a uma lamínula de vidro sobre escarificações feitas na pele de 10 indivíduos adultos jovens por um período de três horas. Decorrido este período, as lamínulas foram removidas, coradas em hematoxilina e eosina, montadas em lâminas de vidro e submetidas à análise em microscópio ótico. Este teste permitiu aos autores analisarem a citotoxicidade e a influência quimiotática dos materiais sobre os PMNS neutrófilos. O OZE, dentre todos os materiais, foi o que exerceu a maior quimiotaxia, embora tenha sido o material que melhor preservou as células estruturalmente. O Sealapex, apesar de ser o material que atraiu o menor número de PMNs neutrófilos, propiciou um grande

aumento na degranulação celular, apresentando considerável citólise. O CRCS apresentou valores intermediários nas duas variáveis analisadas. Em ordem decrescente quanto à agressão e migração celular, os cimentos puderam ser assim classificados: Sealapex, CRCS, OZE.

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são bem tolerados quando introduzidos em cavidades intra-coronárias, mas são altamente irritantes quando colocados em contato direto com o tecido conjuntivo. Assim, muitos testes tem sido sugeridos para avaliar a biocompatibilidade de materiais dentários reproduzindo o mais próximo possível as circunstâncias pretendidas para uso clínico destes materiais. A situação ideal para avaliação da biocompatibilidade seria em humanos, porém as demandas da sociedade moderna para os padrões apropriados de ética e segurança limitam severamente o número de ocasiões em que estes testes possam ser efetuados, pelo menos com relação à uma avaliação inicial. Como consequência, modelos alternativos são necessários, levando assim à utilização de animais. Dentro deste contexto, várias metodologias são utilizadas na avaliação da biocompatibilidade e da citotoxicidade. A biocompatibilidade responde por um todo, já a citotoxicidade considera a reação de um grupo específico de células. Portanto a citotoxicidade é um sub-conjunto do conjunto biocompatibilidade (Browne²⁰, 1994).

Chong et al.²⁹, em 1994, avaliaram a citotoxicidade de materiais para obturação retrógrada, usando o método de filtro Millipore. Foram comparados com o amálgama, o cimento fotopolimerizável à base de ionômero

de vidro (Vitrebond) e três cimentos à base de óxido de zinco e eugenol: Kalzinol, IRM e ácido toxibenzoico (EBA). O IRM fresco exibiu o efeito citotóxico mais pronunciado, comparado com todos os outros materiais. Não houve diferença estatisticamente significante entre Vitrebond à fresco, Kalzinol, cimento EBA e amálgama. Quando endurecido o Kalzinol foi o mais citotóxico e a diferença foi estatisticamente significativa, quando comparada com os outros materiais. O IRM endurecido foi o segundo material mais citotóxico, estatisticamente. A citotoxicidade do Vitrebond, EBA e amálgama não diferiu significativamente dos outros.

Costa et al.³⁰, em 1994, experimentaram a biocompatibilidade dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (OZE) variando a proporção pó/líquido (denso e fluído), através de implantes dorsais em tecido conjuntivo subcutâneo de 32 ratos, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. O cimento de OZE novo e denso promoveu, aos 7 dias moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares, discreta necrose de contato e tendência à organização de fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura tubular. Como o decorrer do período, houve regressão da reação inflamatória, ocorrendo processo de reparação tecidual. Aos 60 dias, houve formação de um tecido conjuntivo com características histológicas de normalidade, estando o tubo totalmente envolto por um tecido fibroso denso, que se mostrou mais irritante ao tecido conjuntivo subcutâneo do rato. Os autores concluíram que o cimento de OZE menos irritante foi o novo/denso.

Cotti e Torabinejad³³ (1994), avaliando a participação dos

metabólicos do ácido araquidônico no processo inflamatório, e considerando que os mesmos são responsáveis por vários sinais clínicos e radiográficos da inflamação como dor e reabsorção radicular; detectaram elevado nível de leucotrieno C4 em 12 lesões periapicais humanas, sem contudo apresentarem diferença estatística significativa quanto à sintomatologia dolorosa.

Holland et al.⁵⁸, em 1994, avaliaram a influência da condição de tratamento do canal radicular sobre o processo de reparo dos tecidos periapicais. Quarenta raízes de dentes de cães foram agrupadas de acordo com os seguintes critérios: 1-canais radiculares obturados após biopulpectomia; 2-canais radiculares expostos ao meio bucal; 3-canais infectados e obturados com óxido de zinco e eugenol; 4-canais infectados e preenchidos com hidróxido de cálcio. Após um período de 6 meses, os cães foram sacrificados e as peças removidas para a realização do exame histológico. O grupo que empregou o hidróxido de cálcio apresentou os melhores resultados em relação ao reparo periapical.

Imagine que é 1985. Você se encontra com um amigo ambientalmente consciente num café com mesas na calçada. Ele está irritado com o trânsito que está poluindo o ar com óxido nítrico (NO). Por sua imaginação ter sido aguçada ao ler um trabalho nos Procedimentos da Academia Nacional de Ciências que relatava a produção de nitrato inorgânico por macrófagos ativados (Mosmann¹⁰¹), você se opõe à reclamação de seu amigo com uma previsão de que os próximos dez anos iriam trazer mais evidências de que o NO é produzido em mofos, gafanhotos, besouros, límulus,

moluscos, frangos, camundongos, ratos, vacas e humanos. Se assim for, seu amigo retruca, isto não seria mais do que fumaça eucariótica, um resíduo (subproduto) do metabolismo L-arginina. Você admite que o NO derivado do aminoácido L-arginina e seus produtos de oxidação serão excretados na saliva das pessoas, respiração e urina, mas você insiste que o NO é um autacóide, não um subproduto. Seus papéis fisiológicos serão no mínimo tão variáveis quanto aqueles descobertos como exemplo, os dos corticosteróides nos anos 40 e 60. Você acha que o NO irá regular o seguinte: ativação do fator de transcrição; translação (interpretação) de mRNAs que controlam o metabolismo do Fe; mutagênese; apoptose; transporte de elétron mitocondrial e de glicólise; ailação de proteína; fusão de mioblastos; adesão de plaquetas e neutrófilos; proliferação dos progenitores de mielóide, células T, queratinócitos e células de tumor, liberação de hormônios da pituitária; a tonicidade dos brônquios e esfínteres; as contrações do estômago, intestinos, útero e coração; ereção do pênis; dependência opioide, tolerância e toxicidade; memória; sono; queimadura solar; e a pressão sangüínea. Você menciona que a produção excessiva de NO pode contribuir para a danificação do tecido na artrite, glomerulonefrite, diabetes, derrame, choque séptico, coqueluche, encefalite autoimune ou viral e colite ulcerativa. Você se apressa em dizer que este dano pode ser o preço a pagar por equipar tantas células hospedeiras com a habilidade de combater este composto contra vírus, protozoários e helmintos. Seu amigo poderá ser perdoado por duvidar de você. Ainda, a última década apresentou tudo isso para ser estudado. Para a fisiologia, a pesquisa de NO garante uma oportunidade inesperada de revisar conceitos básicos que pareciam consignados a um classicismo duradouro. Para a biologia celular, a

ampla oscilação (influência) de um gás sem carbono fornece um novo paradigma. Um relaxante muscular e mediador de aprendizado, o NO nos fez repensar no conceito de que todo sinal intercelular é baseado em interações não covalentes que surgem da ação complementar da forma molecular e abriu nossas mentes para o governo das funções vitais através das reações covalentes de óxido-redução (Nathan e Xie¹⁰², 1994).

De acordo com Schmalz¹²⁸, 1994, outros métodos baseiam-se na exclusão do corante (azul de Trypan). O corante penetra nas células mortas, as quais possuem lesão da membrana celular, o que não ocorre nas células vivas por apresentarem membrana íntegra. Afirmou que dois tipos de células são usados: linhagens de células permanentes derivadas de fontes comerciais ou células primárias derivadas de explantes e estabelecidas em cada laboratório individual. A escolha do método de registro deve ser baseada na informação desejada. Inicialmente, métodos mais simples baseados nos efeitos da membrana ou no índice de proliferação celular deveriam ser usados. Posteriormente, se há necessidade de informações mais detalhadas relativo ao mecanismo de ação tóxica, métodos mais sofisticados baseados na atividade celular deveriam ser usados. Mencionou que o uso do índice de proliferação para registrar o dano celular é um dos métodos mais antigos e mais comumente usados. A contagem celular direta é fácil de realizar e pode ser combinada com um corante vital a fim de excluir as células mortas. Schmalz¹²⁸ (1994), ao realizar experimentos com linhagens de células permanentes e células primárias (células da gengiva, célula do ligamento periodontal), observaram uma tendência para as células primárias serem menos sensíveis

que as linhagens de células permanentes. Porém, os principais efeitos demonstrados nestes testes foram os mesmos, independente do tipo de linhagem celular utilizado.

Stashenko et al.¹⁴³, em 1994, estudaram o mecanismo da patogênese das lesões periapicais usando ratos como modelo experimental, expondo a polpa cirurgicamente. Nestes modelos, lesões periapicais desenvolveram-se rapidamente entre zero e 15 dias (fase aguda) e mais lentamente na fase crônica. A microbiota Gram-negativa, semelhante em humanos, foi rapidamente estabelecida. Nas lesões periapicais encontraram linfócitos T, neutrófilos, linfócitos B (células B), macrófagos e plasmócitos. Os linfócitos T auxiliares (Th) predominaram durante a fase aguda, enquanto os linfócitos T supressores (Ts) foram encontrados com maior frequência na fase crônica. A maior parte da atividade de reabsorção óssea foi mediada pela IL-1 α . Prostaglandinas responderam por 19 a 15 % da atividade de reabsorção. Células que expressam IL-1 α foram identificadas na polpa após o segundo dia de exposição e, nos tecidos periapicais após o sétimo dia de exposição. Células que expressam TNF- α foram também detectadas, no entanto, células que expressam IL-1 β estavam ausentes. Finalmente a destruição óssea periapical foi inibida em 60% pelo tratamento com o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra).

Este estudo foi realizado por Vespa et al.¹⁶³, em 1994, para determinar o papel de reagentes intermediários do nitrogênio nas infecções por *Trypanossoma cruzi*. In vitro, reações antígeno-anticorpo obtidos durante a

fase aguda de infecção, produziu elevada quantidade de óxido nítrico (NO) que foi correlacionada com a resistência ou suscetibilidade dos animais. In vivo, os níveis de NO_2^- mais NO_3^- no plasma durante a infecção foi maior nos ratos C57BL/6 do que nos ratos BALBL/c. Os resultados mostraram que no tratamento de C57BL/6 quando a síntese de óxido nítrico (NO) foi inibida, através de inibidores de NO síntase, houve aumento da parasitemia e mortalidade. Finalmente concluiu-se que o S-nitroso-acetyl-penicillamine é capaz de matar o *Trypanosoma* "in vitro" na presença de outras células, sugerindo que o mediador NO mata *T. cruzi*.

Beltes et al.¹³, em 1995, avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de três cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS e Apexit) usando células L929 e BHK21/C13. Após 24 horas os cimentos foram cobertos com a suspensão celular, e a citotoxicidade determinada por uma técnica quantitativa, mostrando que todos os cimentos apresentaram-se citotóxicos. O Sealapex mostrou alta citotoxicidade. O CRCS foi menos tóxico do que o Sealapex e mais tóxico do que o Apexit.

Cassatella²⁶, em 1995, realizou uma pequena revisão da literatura pela controvérsia em relação à liberação ou não de citocinas pelos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). É sabido que, linfócitos T, células exterminadoras naturais (NK), monócitos/macrófagos, são as principais células produtoras de citocinas, no entanto, nos últimos anos, trabalhos mostram que os PMNs também tem a capacidade de sintetizar e liberar citocinas imunoreguladoras, como o $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, receptor antagônico para

interleucina-1 (IL-1ra), IL-8 e fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- β_1), além de outras. Sabemos que os PMNs são células de vida curta, incapazes de proliferação ou de renovação. Assim, sua capacidade para sintetizar citocinas imunomoduladoras pode ser visto como um fenômeno de pequena significância fisiológica. No entanto, trabalhos mostram que a sobrevivência dos PMNs pode ser estendida pela exposição a microambientes distintos envolvidos na infecção e imunidade. Neste cenário, os PMNs poderiam ser considerados não somente um elemento central ativo na resposta inflamatória, mas também uma célula que, através da secreção de citocinas, pode influenciar a direção e evolução do processo imune.

Economides et al.³⁵, em 1995, avaliaram, *in vivo*, a biocompatibilidade de dois cimentos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex e CRCS), um à base de óxido de zinco e eugenol (Roth 811) e foram observadas nas amostras teciduais subcutâneas obtidas dos animais do grupo do CRCS e Roth 811 (os dois cimentos contêm zinco na sua composição), uma infiltração severa dos cimentos a base de óxido e eugenol no grupo do CRCS e Roth 811 de infiltrado inflamatório crônico de células macrofágicas, linfócitos e plasmócitos e no grupo do Sealapex um infiltrado de moderado a suave.

Gerosa et al.⁴⁶, em 1995, avaliaram a citotoxicidade de 6 cimentos endodônticos, AH26, Pulp Canal Sealer, Rocanal R2, Rocanal R3, Bioseal e Endomethasone, em culturas de fibroblastos humanos obtidos da região dos terceiros molares. Os cimentos foram utilizados após períodos de uma e duas semanas de preparados, de acordo com as instruções dos

fabricantes. Os testes foram realizados em períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados apresentaram o Pulp Canal Sealer como sendo de baixa toxicidade, o Endomethasone, Bioseal e Rocanal R3 de moderada, o Rocanal R2 e AH26 de alta toxicidade, que foi atribuída aos componentes O-fenilfenol do Rocanal R2 e resina epóxi bisfenol do AH26 que supostamente liberam formaldeído durante o endurecimento do cimento, sendo esta, talvez a causa dessa citotoxicidade.

Um modelo experimental, com a finalidade de verificar a neoformação óssea e integração do cimento derivado da poliuretana de mamona no preenchimento de falha óssea produzida, foi desenvolvido por Ignácio⁶¹ (1995). Foram utilizados coelhos machos, com idades variando entre 8-10 semanas de vida, pesando aproximadamente 2 Kg. Devido às características anatômicas dos ossos do antebraço do animal foram produzidas falhas osteoperiostais de 2,0 cm bilateralmente nos raios (correspondendo a aproximadamente 30% do comprimento total do osso), que foram preenchidas com cimento derivado do polímero de mamona. Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tempo de ser mortos de cada um em 2, 4, 8 e 16 semanas, fazendo-se o estudo radiológico, macroscópico e histológico em cada tempo de observação. Um grupo controle composto por 6 animais, onde a falha osteoperiostal de 2,0 cm bilateralmente era deixada sem preenchimento, também foi estudado. Uma análise dos resultados demonstrou que, apesar da membrana inter-óssea potente e de um forte sistema ligamentar que une os dois ossos, todos os seguimentos do grupo controle tiveram perda do alinhamento do membro (deslizamentos epifisários e fraturas), ao contrário dos

antebraços, onde a falha óssea produzida foi preenchida com o cimento derivado do polímero da mamona, que suportam bem as forças mecânicas exercidas pela marcha normal. Radiograficamente, nos animais em que foi implantado o cimento derivado do polímero da mamona houve, na quase totalidade dos casos, união sólida das interfaces cimento/osso proximal e distal. O osso neoformado, a partir das extremidades ósseas proximal e distal, praticamente uniu-se na região central do enxerto nos períodos finais do estudo. visualizando-se, em alguns casos, a formação de uma cortical óssea delgada e esboço de um canal medular. Histologicamente, não foi verificada a presença de células gigante de corpo estranho que pudesse indicar qualquer grau de toxicidade do material. O processo de neoformação óssea foi gradual, progressivo e organizado a partir das interfaces cimento/osso proximal e distal em direção à região central do material, iniciando-se por um processo inflamatório decorrente da agressão produzida pelo ato cirúrgico, processo estes que diminuiu paulatinamente. A formação fibroblástica foi substituída por lamelas ósseas ao longo do tempo, que praticamente uniram-se na região central do cimento no grupo de avaliação mais longo (16 semanas). Foi também observada a formação de uma cortical fina e um neo-periósteo cobrindo o tecido ósseo neoformado.

Mittal et al.⁹⁷, em 1995, avaliaram histologicamente a resposta tecidual frente a quatro cimentos obturadores de canais radiculares (OZE, Tubliseal, Sealapex e Endoflas F.S.). Utilizaram 15 ratos albinos adultos, nos quais foi injetado no tecido subcutâneo da região dorsal, 0,1mL de material espatulado. Os animais foram sacrificados 48 horas, 7, 14 dias, 1 e 3

meses após a injeção subcutânea. Os resultados histológicos revelaram que todos os cimentos causaram inflamação, a qual diminuiu com o decorrer do período, exceto no caso do OZE, que aumentou no período de 48 horas até 7 dias, tendendo a seguir, à uma diminuição. O Sealapex quando comparado com os outros cimentos utilizados, foi o material que mostrou a menor reação inflamatória, ocorrendo junto ao mesmo, uma reação inflamatória moderada somente até as 48 horas, a qual descreveu para suave nos demais períodos. O OZE Tubliseal e o Endoflas FS foram severamente tóxicos nos períodos de 48 horas e 7 dias, tendo esta toxicidade diminuída gradualmente nos períodos mais prolongados. Nenhuma reação inflamatória foi observada aos 3 meses, em todos os cimentos testados.

Um estudo para determinar se a produção de óxido nítrico (NO) pela ativação de culturas de macrófagos em níveis fisiológicos de arginina, ou através do aumento na disponibilidade de arginina como substrato para síntese de NO foi realizado por Norris et al.¹⁰³, em 1995. A geração de NO pelos macrófagos é largamente responsável pela morte do *Trypanosoma cruzi*. O aumento exógeno de arginina ou citrulina resultou em significativo aumento da produção de NO e da sua completa liberação nos parasitas através da atividade macrofágica. A citrulina foi substituída totalmente pela arginina no suporte da produção de NO e na atividade de destruição do *Trypanosoma*. Estes resultados demonstraram que na expressão e ativação do ciclo da citrulina, NO são liberados pelos macrófagos. Os níveis de arginina no plasma são limitados em respeito a produção de NO no sangue e da atividade de destruição do *Trypanosoma* nestas células. Segundo os autores, o aumento

dos níveis de substrato no plasma, em vez de arginina no sangue e biosíntese de NO, pode representar um meio de aumentar a atividade antimicrobiana “in vivo”.

Silva¹³⁴, em 1995, realizou avaliação histológica após obturação de canais radiculares em dentes de cães com vitalidade pulpar, empregando quatro diferentes cimentos que contêm hidróxido de cálcio. Os resultados, 180 dias após a obturação, demonstraram que o cimento Sealapex foi o que melhor permitiu a deposição de tecido mineralizado, apicalmente, sendo o único a apresentar selamento apical completo e com predomínio de infiltrado inflamatório ausente/suave. O CRCS apresentou predominantemente, selamento parcial e infiltrado inflamatório moderado, e o Apexit e Sealer 26 não apresentaram selamento. A avaliação histopatológica da reação provocada pelos cimentos após injeção em tecido subcutâneo de camundongos isogênicos Balb/c, realizada no período de 2, 4, 8 e 16 dias, mostrou no período inicial, intenso infiltrado de leucócitos polimorfonucleares nos quatro cimentos estudados. A partir do oitavo dia foi observada intensa redução dessas células, particularmente no Sealapex, que apresentou a maior diferenciação celular. Foi realizado, ainda, o estudo da migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, nos períodos de 6 e 24 horas, 5, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que nos períodos iniciais todos os cimentos induziram a um aumento de neutrófilos, quando comparados ao controle, tendo o Sealapex e CRCS apresentado menores valores, atingindo valores semelhantes ao controle aos 5 dias. Finalmente, a análise do pH e condutividade dos cimentos nos períodos de zero, 1, 2, 4, 6 e 24 horas, 5, 15 e 30 dias, mostraram que o

cimento Sealapex, durante todos os períodos experimentais, foi o que determinou maiores valores de pH, cálcio total e de cálcio iônico, seguido do CRCS, Apexit e Sealer 26.

Tani-Ishii et al.¹⁴⁹, em 1995, verificaram a relação entre citocinas responsáveis pela reabsorção óssea e a presença das possíveis células que as expressam. Citocinas relacionadas à reabsorção óssea, IL-1 e TNF, tem sido relacionadas na patogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo pulpites e periodontites apicais. Os autores identificaram células que expressam IL-1 α e TNF- α em polpas expostas infectadas e durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos. Detectaram por imunohistoquímica, IL-1 α e TNF- α presentes no segundo dia tanto na exposição pulpar quanto na região periapical. O número destas citocinas aumentou no quarto dia na polpa e depois do trigésimo dia no periápice. As células que expressam IL-1 α e TNF- α foram identificadas como macrófagos e fibroblastos com ocasionais marcadores para leucócitos polimorfonucleares. Entretanto, linfócitos não foram identificados. Portanto, os achados demonstraram que as células que expressam estas citocinas (IL-1 α e TNF- α) estão presentes imediatamente após a exposição pulpar neste modelo de estudo, com a forte hipótese delas serem os mediadores chave da patogênese pulpar e periapical, incluindo a destruição óssea.

Avaliando a participação dos linfócitos T na patogênese periapical, Tani-ishi et al.¹⁵⁰, em 1995, verificaram que nos camundongos deficientes de células T, no período de 2 semanas, o tamanho da lesão foi

duas vezes maior que nos camundongos normais, sugerindo que essas lesões possuíam mais fatores de reabsorção óssea (PGE_2 , IL-1 e TNF). Todos os camundongos apresentaram abscessos periapicais, em duas semanas, sendo difuso nos ratos normais e do tipo localizado nos deficientes. Logo a formação da lesão não requereu a presença de células T. Nos camundongos normais, o tamanho da lesão permaneceu inalterado da 6ª a 8ª semanas; enquanto nos camundongos deficientes de células T a área da lesão diminuiu na oitava semana, envolvendo para escara, enquanto nos camundongos normais, a lesão estava infiltrada com numerosos neutrófilos, macrófagos e linfócitos - tecido granulomatoso. Os resultados deste trabalho sugerem que a progressão da lesão requer modificação induzida pelas células T auxiliares.

Os monócitos são células do sistema monocítico fagocitário, proveniente da medula óssea, atingindo a corrente sanguínea sem estarem completamente diferenciadas, ao atingirem os tecidos, amadurecem se formando macrófagos. Os macrófagos fazem parte, juntamente com mastócitos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos da resposta inflamatória, resposta essa de defesa do organismo que ocorre no tecido conjuntivo visando destruir, diluir e isolar o agente agressor através da fagocitose. A fagocitose é uma das importantes atividades dos macrófagos que tem a capacidade de sintetizar e secretar enzimas e fatores reguladores da atividade de outras células como as citocinas e fatores de crescimento. A liberação de linfocinas pelos linfócitos T promove a ativação de macrófagos para sensibilizá-los contra antígenos de organismos infectados (Cotran et al.³², 1996).

Gerosa et al.⁴⁵, em 1996, avaliaram, *in vitro*, a citotoxicidade de quatro marcas de eugenol após sua diluição em solução de álcool em várias concentrações, determinando, dessa forma, a máxima concentração não citotóxica. A citotoxicidade do álcool foi determinada por uma curva de dose responsável na concentração entre 0,017M e 1,7M. O teste de citotoxicidade do álcool mostrou que as células vivas permaneceram totalmente inalteradas no grupo controle (células não expostas ao álcool). Várias concentrações (0,015 a 947 μ M) para cada eugenol em álcool foram preparadas; 20 μ L (0,34M) de álcool etílico foi adicionada para 1mL do meio de células. Os quatro eugenóis foram tóxicos para os fibroblastos do ligamento periodontal. A marca Sigma de eugenol numa solução alcoólica a <0,230 μ M foi não tóxica. Eusol não foi tóxico e <0,030 μ M, o Bioseal não foi tóxico a <0,470 μ M, e o Kerr a <0,120 μ M.

Miller et al.⁹⁶, em 1996, pesquisando imunocitoquimicamente o infiltrado celular das lesões periapicais humanas, obtidas cirurgicamente, certificaram que nos granulomas, as citocinas IL-1 β e IL-1 α , foram identificadas no infiltrado neutrofilico em 92 e 93%, respectivamente. Ademais, a estimulação destas células com LPS de *Escherichia coli*, forneceu significativos níveis adicionais dessas citocinas, tanto nos supernadantes, quanto nos lisados de células. Em vista do grande número de células nas lesões periapicais, positivas imunocitoquimicamente para IL-1 β e IL-1 α , e considerando o amplo espectro de atividade metabólica, catalítica, imunológica, fisiológica e hematopoiética; entendem que estas citocinas desempenham importantes funções na evolução das lesões periapicais.

Schmalz et al.¹²⁹, em 1996, avaliaram a citotoxicidade do cimento fosfato de zinco, de cimentos à base de ionômero de vidro (Ketac-Fil, Ketac-Silver e Vitrebond) e de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol, tendo como controle negativo o silicone vinil atóxico e, como controle positivo, uma solução aquosa de Fenol a 1,5%. Para a confecção do teste da barreira dentinária, utilizaram discos de dentina de 500µm de espessura, obtidos de dentes bovinos anteriores, condicionados com ácido cítrico a 50%, por 30 segundos, em seu lado "pulpar". A seguir, os discos de dentina foram autoclavados (Grupo A) ou desinfetados em etanol, por 15 minutos, e lavados com solução salina (Grupo B). No lado "pulpar" dos discos de dentina, foram semeadas células L929 e, no lado "cavitário" dos mesmos, foram colocados os materiais a serem testados. Decorridas 24 horas, efetuou-se a contagem das células viáveis, coradas com diacetato de fluoresceína. De acordo com os resultados obtidos, o Vitrebond e o óxido de zinco e eugenol foram os materiais mais citotóxicos, sendo o Ketac-Fil e o Ketac-Silver menos citotóxico que o Vitrebond. O cimento fosfato de zinco apresentou citotoxicidade moderada. A desinfecção dos discos de dentina, em comparação à autoclavagem, reduziu a citotoxicidade dos materiais. Os autores salientaram que, devido à alta citotoxicidade observada com o óxido de zinco e eugenol e ionômero de vidro, contrastante com os resultados obtidos em pesquisas *in vivo*, estudos adicionais devem ser efetuados utilizando a metodologia do teste da barreira dentinária.

Takayama et al.¹⁴⁸ (1996), verificaram que os dentes portadores de radiolucidez periapical apresentavam maior concentração de

PGE₂ em relação aos sem lesão periapical. Similarmente, a presença de dor espontânea ou sensibilidade a percussão, foi positivamente correlacionada com alta concentração de PGE₂. No entanto, não houve significativa diferença entre a concentração de PGE₂ e o tamanho da lesão periapical.

Também macrófagos e linfócitos desempenham papel essencial no mecanismo mediado por células envolvidas na inflamação crônica (Trowbridge e Emiling¹⁵⁹, 1996).

Almeida², em 1997, avaliou histologicamente a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, após biopulpectomia e obturação dos canais radiculares com os cimentos Ketac Endo, Fill Canal e AH Plus. O cimento Ketac Endo foi avaliado após 270 dias tendo como controle o Fill Canal; o AH Plus foi avaliado após 90 dias tendo também o Fill Canal como controle. O Ketac Endo não apresentou selamento apical total em nenhum dos casos, e nos casos de selamento parcial, o tecido conjuntivo intersticial contido entre as paredes do selamento neoformado, apresentava infiltrado inflamatório mononuclear suave/moderado, poucas fibras colágenas, edema e poucos cementoblastos junto à parede do selamento. Em contato com o cimento obturador, havia necrose superficial e congestão vascular. Nos casos de ausência de selamento, o tecido intersticial apresentava também áreas de necrose em contato com o material obturador, e moderado/severo infiltrado inflamatório mononuclear que se estendia até o periápice. No grupo do Fill Canal, após 270 dias, nos casos de selamento parcial, o tecido intersticial invaginado para o interior do canal radicular apresentava poucos fibroblastos e

fibras colágenas e quando em contato com o material obturador, havia necrose e infiltrado inflamatório moderado, constituído predominantemente por células mononucleares. A região periapical apresentava resposta inflamatória de intensidade moderada/severa, constituída por células mononucleares, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas. No AH Plus após 90 dias, nos casos de selamento parcial, o tecido intersticial apresentava numerosos fibroblastos, intensa presença de fibras colágenas e ausência de células inflamatórias, exceto raros macrófagos, e as ramificações do delta apical apresentavam tecido conjuntivo íntegro. O Fill Canal após 90 dias na região periapical evidenciava resposta inflamatória de intensidade moderada/severa, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas dissociadas.

A liberação de TNF- α por monócitos após a exposição ao hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] e LPS da *Escherichia coli* foi estudado por Barthel et al.¹⁰, em 1997. O LPS, é um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas anaeróbias, e tem sido relacionado com a patogenia da doença periodontal, resultando da infecção do canal radicular. O hidróxido de cálcio tem se mostrado um medicamento ou curativo biológico, efetivo em infecções deste nível, reduzindo a microbiota dentro do canal; e tem sido proposto que seu efeito terapêutico pode, também ser resultado da inativação direta do LPS. A proposta deste estudo foi analisar se o LPS da *Escherichia coli* pode ser reduzido ou eliminado com o Ca(OH)₂. Quatro concentrações de LPS da *Escherichia coli* foram colocados em 1-1000mg/mL de água estéril e cada uma com 25mg de Ca(OH)₂ em água estéril. O grupo controle ficou com LPS e água sem Ca(OH)₂. Os resultados indicaram que o Ca(OH)₂, é capaz de

eliminar o efeito tóxico do LPS da *Escherichia coli* e estimular a produção de TNF- α pelos monócitos.

O primeiro e único trabalho de pesquisa no campo odontológico, encontrado na literatura, foi desenvolvido por Costa et al.³¹ (1997) que testaram a biocompatibilidade da poliuretana de mamona colocada em tubos de polietileno, que foram implantados no dorso de ratos por períodos de observação de 7, 15, 30 e 60 dias. O material foi comparado com o óxido de zinco e eugenol (OZE). Aos 7 e 15 dias a poliuretana promoveu moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares, novos vasos sangüíneos e degradação de colágeno. Esses eventos histopatológicos foram menos relevantes para o OZE. Com o decorrer dos períodos, foi notada regressão dos eventos inflamatórios e reparação junto à abertura dos tubos. Aos 30 e 60 dias, um tecido fibroso denso envolvia o tubo de polietileno, sendo que para ambos materiais, o tecido conjuntivo adjacente apresentava características histológicas de normalidade. O OZE foi menos irritante que a poliuretana quando implantado, porém os materiais apresentaram biocompatibilidade aceitável.

Geurtsen e Leyhausen⁴⁷, em 1997, pensando em minimizar a incidência de efeitos colaterais e/ou sistêmicos, sugeriram que a biocompatibilidade de todos materiais obturadores de canais radiculares, deveria ser investigada por vários testes *in vitro* e *in vivo* antes da sua aplicação clínica. Os testes *in vitro* incluem mutagenicidade, citotoxicidade e efeitos antibacterianos. Trabalhos tem mostrado que cimentos à base de óxido

de zinco e eugenol contém paraformaldeído (N2 e Endométhasone), mostrando uma forte atividade antibacteriana, porém são freqüentemente mutagênicos. Cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são classificados como sendo altamente/severamente citotóxicos, contrário àqueles à base de hidróxido de cálcio (Sealapex e Apexit), que apresentam boa ou excelente citocompatibilidade. Estes resultados foram confirmados por numerosos trabalhos histológicos *in vivo*.

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imune. Eles se originam na medula óssea como monócitos sangüíneos e, após migração e maturação, vão para os tecidos como macrófagos maduros. Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos e suas principais funções incluem a fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos e produção de citocinas (IL-6, TNF- α , IL-1, IL-12) e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H₂O₂). Deste modo, os macrófagos podem participar de ambas respostas imunes, inata e adaptativa. Os macrófagos exercem a maior função na defesa do hospedeiro contra infecções e formação de tumores. De particular interesse, o NO e H₂O₂ produzidos pelos macrófagos atuam destruindo ou inibindo o crescimento de bactérias, fungos, parasitas e células tumorais. O termo macrófago ativado é amplamente utilizado para designar o aumento de suas atividades biológicas. Muitos parâmetros, tais como aderência, fagocitose, atividade bactericida e características bioquímicas podem ser tomados como indicativos do grau de ativação destas células. O Óxido Nítrico é produzido pela indução da enzima óxido nítrico sintase nas células imunes em resposta a

citocinas, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-2 (Janeway e Traves⁶², 1997).

Kharmandayan⁷¹ (1997) estudou através de implantes em osso de coelho, a interface entre o osso e o pino de poliuretana, durante o processo de reparação do tecido nos tempos de observação de 1, 30, 60, 120, 180 e 360 dias de pós-operatório, utilizando microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que no primeiro dia de pós-operatório, a parede do canal de implante do pino estava revestida por smear layer, conseqüente à ação da broca. Os grupos de 30, 60, 120 dias e pós-operatório, mostraram a formação de tecido colágeno denso envolvendo a superfície do pino. Pequenas irregularidades de superfície dos implantes foram notadas nestes grupos, revelando a adesão do colágeno à superfície da resina, o que provocou uma reparação na interface osso/pino. As trabéculas ósseas adjacentes revelaram uma disposição irregular tanto em cortes histológicos, como nos aspectos tridimensionais em imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura. A orientação de fibras colágenas era notada nitidamente envolvendo a superfície do pino. Nos grupos de 180 e 360 dias de pós-operatório, houve uma formação de fibras colágenas de disposição ordenada. Os aspectos histológicos revelaram a presença de um tecido conjuntivo denso constituindo a interface osso/pino. O implante de poliuretana foi acompanhado de uma neoformação óssea bem evidente, na porção próxima à superfície que se estendeu até a profundidade do canal. Além disso, os dados obtidos revelaram diferenças apenas de aspectos estruturais decorrentes da reparação do tecido, nas fases examinadas, mais intensas no grupo de 360 dias de pós-operatório e com pinos com carbonato de cálcio.

Leonardo et al.⁸⁵, em 1997, analisaram a biocompatibilidade de cimentos obturadores de canais radiculares. Foram utilizados 80 raízes de pré-molares de cães com vitalidade pulpar. Após preparo biomecânico os dentes foram obturados alternadamente com guta-percha e os cimentos Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Apexit. Após 180 dias os cães foram sacrificados, as peças anatômicas removidas e submetidas à histotécnica. A análise microscópica evidenciou que o Sealapex permitiu um maior número de mineralizações apicais e ausência de infiltrado inflamatório apical. O selamento observado com o CRCS foi parcial e notou-se pequeno infiltrado inflamatório. O selamento observado com o Sealer 26 foi parcial e notou-se pequeno infiltrado inflamatório. Nenhum selamento apical com tecido mineralizado foi observado no uso do Apexit e Sealer 26, com infiltrado inflamatório severo no Apexit e leve no Sealer 26.

Leonardo⁸⁷, em 1997, avaliou em cultura de macrófagos em períodos de 1, 12, 24, 48 e 72 horas, a citotoxicidade de cinco cimentos endodônticos: Sealapex, Sealer 26, Apexit, CRCS e Fill Canal. Foram avaliadas as alterações morfológicas e a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Quanto às alterações morfológicas, todos os cimentos foram tóxicos, Numa ordem crescente de toxicidade, foram mais agressivos que o controle o Fill Canal, CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex. Quanto à liberação de H₂O₂ a ordem crescente de toxicidade foi Sealer 26, Fill Canal, Apexit, Sealapex e CRCS. Quando um cimento obturador de canais radiculares, entra em contacto com o tecido conjuntivo periapical, promoverá à estimulação e ativação dos macrófagos, para a realização da fagocitose. Os reagentes intermediários do

oxigênio (peróxido de hidrogênio) e os reagentes intermediários do nitrogênio (óxido nítrico) (provenientes da atividade fagocitária) são indicativos de citotoxicidade.

Rasquin¹²³, em 1997, fez avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dentes de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após tratamento de canais radiculares e obturação com os cimentos Sealapex, Sealer 26, Apexit e Fill Canal. Foram utilizados 80 canais radiculares portadores de necrose pulpar e reação periapical crônica. Decorridos 270 dias da obturação, os animais foram sacrificados. Após o processamento histológico os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Mallory. A análise microscópica dos cortes evidenciou ser o Sealapex biologicamente compatível, e a resposta tecidual em ordem crescente de severidade foi a seguinte: Sealer 26, Fill Canal e Apexit.

Em 1997, Roslindo et al.¹²⁷, estudaram experimentalmente germes dentários de primeiros molares inferiores, de fetos de camundongos com 17 dias, cultivados in vitro durante 6 dias juntamente com resina poliuretana vegetal. Os germes dentários foram incubados em meio de cultura em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂ a 37°C. A resina poliuretana vegetal elaborada a partir do óleo de mamona foi testada isoladamente ou acrescida de 50% de carbonato de cálcio. A resina poliuretana vegetal, avaliada isoladamente ou acrescida de carbonato de cálcio, mostrou-se compatível com o desenvolvimento dos germes dentários quando cultivados

in vitro, sugerindo a não liberação de substâncias tóxicas para o meio de cultura.

Segura et al.¹³³, em 1997, estudaram o efeito do hidróxido de cálcio na capacidade de adesão dos macrófagos ao substrato na resposta inflamatória. Após a estimulação, os macrófagos eram recolhidos da cavidade abdominal de ratos Wistar e resuspensos em meio RPMI 1640-C. A análise da capacidade de aderência ao substrato foi feita em tubos *ependorf* após 15 minutos de incubação a 37°C, com tensão de 5% CO₂, e 100% de umidade atmosférica. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio diminuiu a capacidade de aderência dos macrófagos ao substrato dependendo da dose e do tempo. Os autores concluíram que devido a influência do hidróxido de cálcio na adesão, primeiro passo no processo de fagocitose, há uma redução da reação inflamatória dos tecidos periapicais, além disso, este efeito é capaz de explicar a fase final da capacidade do hidróxido de cálcio em induzir a mineralização.

Silva et al.¹³⁵, em 1997, avaliaram a resposta inflamatória do Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 em tecido subcutâneo e cavidade peritoneal de ratos Balb/C. A resposta inflamatória em subcutâneos foi avaliada após 2, 4, 8 e 16 dias. Intensa neutrofilia foi vista em resposta a todos os cimentos durante os períodos iniciais. Houve diferenças entre eles relacionadas à presença de necrose e o número de células inflamatórias. Na fase intermediária marcada pela diferenciação celular do sistema fagocítico mononucleado em macrófagos, células epitelióides e células gigantes

multinucleadas foram observadas com o Sealapex. Esta resposta foi menos intensa que o CRCS e Apexit. Necrose do tecido foi observada somente na interface tecido cimento e somente durante o período inicial com o Sealapex, mas foi visto ao longo do experimento com todos os outros cimentos. Na cavidade peritoneal dos animais, foram injetados, soluções contendo os cimentos e cinco ratos de cada grupo foram sacrificados após 6, 24 horas e 5 e 15 dias. Durante os períodos iniciais (6 e 24 horas), houve uma migração intensiva de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal, em resposta para todos os cimentos comparada ao controle. Esta migração foi mais intensa para o Sealer 26 e Apexit. Um aumento do número de células mononucleares foi observado depois de 6 e 24 horas e 5 dias para todos os cimentos, e nenhuma diferença foi observada em relação ao controle depois de 15 dias.

Vajrabhaya e Sithisarn¹⁶¹, em 1997, avaliaram a citotoxicidade de seis cimentos obturadores de canal radicular (Apexit, AH26, MU Sealer, ROCANAL 2, ROCANAL 3, Endométhasone) em culturas monolineares e multilineares de fibroblastos de ratos. As culturas foram mantidas a 37°C, com tensão de 5% de CO₂, e 100% de umidade, em meio de Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. As concentrações eram de 5x10⁵ células nas culturas monolineares, e 1x10⁶ células nas culturas multilineares. Os cimentos eram incubados por quatro horas junto às células, em seguida feita a análise através da liberação de ⁵¹Cr. Os resultados mostraram que o ROCANAL 3, ROCANAL 2, Endométhasone e o MU Sealer não apresentaram diferença estatística entre eles, porém estes materiais foram mais tóxicos que

o AH26 e o Apexit. Comparando-se as culturas monolinesares e multilinesares não houve diferença estatística entre a porcentagem de células viáveis.

Vajrabhaya et al.¹⁶², em 1997, compararam dois métodos de avaliação da citotoxicidade em seis cimentos (MU-Mahidol Universit, ROCANAL 2, ROCANAL 3, Apexit, Endométhasone e AH26). Foram utilizados os métodos de coloração com sulforodamina B e liberação de cromo radioativo (⁵¹Cr), em culturas de células monolinesares (5×10^5) de ratos. Após a incubação a 37°C, com tensão de 5% de CO₂ por 24 horas na presença dos cimentos, as células eram coradas pela sulforodamina B, e feita a leitura através de um espectrofotômetro com um filtro de 540nm para determinar a quantidade de células viáveis, em seguida, foi realizado o teste de liberação de ⁵¹Cr. Os resultados mostraram que através da coloração com a sulforodamina B apenas o Apexit não foi citotóxico, já através do método de liberação de ⁵¹Cr, nenhum cimento mostrou-se citotóxico, deixando claro que os dois métodos são capazes de produzir resultados diferentes.

Bratel et al.¹⁹, em 1998, fizeram um estudo *in vitro* para verificar o efeito de componentes de cimentos endodôntico na função do sistema imune com relação a um tipo de alteração de hipersensibilidade. Extratos dos cimentos AH26, Apexit, Endométhasone e cimento de Grossman, foram preparados para serem usados em culturas de células. Os testes mostraram que os cimentos AH26 e Endométhasone levaram a uma forte redução na proliferação celular de linfócitos T. O cimento de Grossman em altas concentrações também diminuiu a divisão celular.

A ativação dos macrófagos e linfócitos produz uma série de alterações morfofuncionais, como exemplo capacidade fagocítica, bactericida e citotóxicas aumentadas. Macrófagos peritoneais de ratas, como modelo celular "in vitro" são de fácil obtenção para experimentar respostas celulares frente a pastas e cimentos endodônticos, auxiliando a investigação da biocompatibilidade destes materiais especialmente sobre seus efeitos na resposta inflamatória e imune (Egea e Rubio-Manzanares³⁶, 1998).

Frascino⁴⁰ (1998) também desenvolveu modelo experimental com a finalidade de avaliar a viabilidade da utilização de implante de resina poliuretana vegetal na reparação de falhas ósseas na calota craniana de coelhos, analisando os fenômenos de osteocondução, osteogênese, osteoindução, incorporação e osteopromoção. Foram produzidas falhas ósseas com área média de 1,5 cm² de espessura total, desperiostizadas bilateralmente, que estavam afastadas cerca de 3 mm da linha médio craniana. Oito animais formaram o grupo controle, onde as falhas foram deixadas sem preenchimento e 18 tiveram as falhas ósseas preenchidas com um implante de resina poliuretana, por tempos de observação de 2, 6, 12, 18 e 24 semanas. As avaliações macroscópicas, radiológicas e histológicas não mostraram reparação dos defeitos por neoformação óssea em nenhum dos animais do grupo controle. As falhas ósseas eram ocupadas por tecido cicatricial, com formação de uma membrana fibrosa no local. Os animais que receberam a poliuretana apresentaram, a partir de 6 semanas, neoformação óssea, reparando o defeito em suas porções periféricas. A partir desse período, observou-se uma fragmentação irregular e progressiva da resina implantada,

acompanhada de deslocamento de seus fragmentos nos casos mais tardios, permitindo a ocorrência de osteogênese e osteocondução, com osso neoformado, reparando satisfatoriamente as falhas produzidas. Este processo foi também favorecido pela ocorrência de osteopromoção, com implantes exercendo um "efeito membrana" nos leitos de implantação. Em apenas um animal, com 24 semanas, não foram observadas neoformação óssea e fragmentação de resina. Não foi observada atividade fagocitária com os implantes, não sendo incorporados até 24 semanas de observação, embora se tenha considerado a possibilidade da ocorrência de degradação metabólica dos implantes, por mecanismo ainda desconhecido. Não foram observados fenômenos tóxicos ou reacionais, secundários à presença dos implantes. Não foram observadas propriedades osteoindutivas nos implantes.

Em 1998, Fuentesfria et al.⁴², desenvolveram um modelo experimental, com o objetivo de avaliar, através de microscopia óptica, as reações teciduais frente ao implante intra-óssea do polímero da mamona em tíbia de ratos. Trabalhou-se com ratos Norvegicus wistar, com aproximadamente um ano de idade e pesando 340g, em média. Os animais foram divididos em três grupos de ratos, denominados de A, B e C, sendo cada grupo subdividido em dois subgrupos, teste e controle, de acordo com o tempo de observação: A1 e A2 - 21 dias; B1 e B2 - 14 dias e C1 e C2 - 7 dias. Todas as peças operatórias foram radiografadas e processadas pela técnica histológica corrente, sendo os cortes corados por hematoxilina e eosina. Os achados histológicos demonstraram que o uso da poliuretana vegetal, como material de implante, não apresentou diferença estatisticamente significativa

em relação aos respectivos controles. A ausência de abscessos e reação de corpo estranho possibilitam considerar estes fatores como indicativos de biocompatibilidade do material. O início de osteogênese foi mais precoce nas amostras tratadas com poliuretana vegetal, com avaliação estatística positiva, em relação às respectivas amostras-controle, no subgrupo C2. Os resultados obtidos recomendam a continuação das pesquisas com esse material.

Geurtsen et al.⁴⁸, em 1998, avaliaram a citotoxicidade de quatro cimentos obturadores de canais radiculares (AH26, Apexit, Sealapex e N2) e guta-percha, em células 3T3 e cultura primária de fibroblastos do ligamento periodontal humano, pela determinação da proliferação destas células por meio de fluorcromo. Observaram que nenhuma alteração celular significativamente foi induzida pela guta-percha e Apexit, enquanto vários extratos de AH26 e Sealapex causaram moderada ou severa inibição do crescimento destas células. Dano celular severo foi observado por todos os extratos de N2, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais cimentos.

Kolokouris et al.⁷⁶, em 1998, verificaram no tecido conjuntivo subcutâneo de 44 camundongos fêmeas Wistar, a biocompatibilidade de dois cimentos obturadores de canais radiculares, o Apexit à base de hidróxido de cálcio, e o Pulp Canal Sealer à base de óxido de zinco e eugenol. Estes cimentos, devidamente manipulados, foram inseridos em tubos de teflon para então serem implantados no dorso dos animais. Os implantes foram removidos depois de 5, 15, 60 e 120 dias, fixados e preparados para avaliação

microscópica. Observaram uma severa reação inflamatória com extensões necróticas para o Apexit no quinto e décimo quinto dias, porém a intensidade desta reação diminuiu no sexagésimo dia chegando a um nível mínimo no septuagésimo vigésimo dia, caracterizado pela presença de tecido conjuntivo com poucos macrófagos. Resultados semelhantes ocorreram com o Pulp Canal Sealer, onde verificaram uma reação inflamatória nos períodos finais pouco maior do que ocorreu com o Apexit.

O TNF- α , liberado por macrófagos perante agentes irritantes, é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, atuando no início da resposta imune e regulando a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, está envolvido em eventos locais e sistêmicos, contínuos à inflamação (Markhatadze⁹¹, 1998).

Ransjö et al.¹²¹, em 1998, realizaram um estudo sobre a bradicinina e trombina que sinergicamente potencializaram a IL-1 e o TNF- α na biossíntese prostanoíde induzida em fibroblastos pulpares de dentes humanos, quando potencializam agentes irritantes em ações sobre os macrófagos.

Tanomaru Filho et al.¹⁵¹, em 1998, avaliaram o efeito de cimentos obturadores de canais radiculares na reparação apical e periapical de dentes de cães com necro pulpar e reação periapical crônica. Foram utilizados 33 pré-molares de 3 cães nos quais, após anestesia, foram realizadas a abertura coronária e a remoção do tecido pulpar. Durante sete dias, os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal para efeito de

contaminação. Decorrido esse período, as cavidades oclusais foram seladas com cimento à base de óxido de zinco e eugenol e a cada 15 dias foi realizada uma tomada radiográfica para constatação da formação de lesão periapical. Após a formação da lesão, o tratamento endodôntico foi realizado através da técnica clássica de instrumentação utilizando o hipoclorito de sódio a 5,25% como solução irrigadora. O comprimento real de trabalho foi estabelecido a 2mm aquém do ápice radiográfico. Após o preparo biomecânico os canais radiculares foram preenchidos com solução de EDTA a 14,3%, agitada com uma lima tipo K durante 3 minutos. A seguir, um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen-PMCC) foi levado no interior dos canais radiculares, permanecendo por 7 dias. Após este período, o curativo foi removido e os canais radiculares obturados com o cimento Sealapex (Grupo I) e Fill Canal (Grupo III). Os animais foram sacrificados após 270 dias, e as peças anatômicas removidas e submetidas à histotécnica. Os resultados obtidos com o grupo do Sealapex, foram significativamente melhor em termos de reparo histopatológico, quando comparados com o grupo do Fill Canal. Selamentos parciais foram mais frequentes no grupo do Sealapex (73,7%), do que no grupo do Fill Canal (7,1%). Nos casos de contato do material obturador com os tecidos periapicais, o Fill Canal provocou um severo infiltrado inflamatório, ao contrário do Sealapex, mostrando intensa atividade macrofágica e formação de áreas mineralizadas próximas a ele.

Ersev et al.³⁸, em 1999, avaliaram a citotoxicidade (células L929) e mutagenicidade (teste Ames) de vários cimentos endodônticos *in vitro*. A atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos que contém substâncias

como o paraformaldeído, eugenol e timol, ajudam a destruir algumas bactérias remanescentes. Por outro lado, severa toxicidade de um cimento endodôntico pode levar a danos teciduais. O cimento à base de resina, AH26, causou severa irritação nos períodos iniciais de observação, entretanto, reações leves foram relatadas após longo tempo de observação. Cimentos à base de hidróxido de cálcio mostraram leve para moderada irritação tecidual. No teste de mutagenicidade (Teste de Ames), o cimento à base de resina AH26 mostrou potencial genotóxico, o qual foi atribuído a um componente da fórmula, o diglicidil éter bisfenol-A.

Guigand et al.⁵², em 1999, avaliaram a citocompatibilidade de três cimentos endodônticos (à base de óxido de zinco e eugenol, à base de hidróxido de cálcio e à base de óxido de cálcio). Utilizaram uma linhagem de fibroblastos de camundongos (NIH3T3), usando um sistema que simulasse condições *in vivo*, onde o material dos cimentos permanecia no meio de cultura contendo os fibroblastos, separados por uma membrana de policarbonato. A biocompatibilidade foi avaliada 24, 72 e 168 horas após o contato, e os resultados obtidos envolveram o teste de citotoxicidade colorimétrico, a microscopia eletrônica de varredura e a citometria contínua. O presente estudo demonstrou que cimentos à base de óxido de cálcio são tão biocompatíveis quanto a maioria dos cimentos à base de hidróxido de cálcio. Uma maior citotoxicidade foi encontrada para o cimento à base de óxido de zinco e eugenol. No entanto, estes testes "*in vitro*", constituem somente o primeiro passo e não uma reprodução precisa das condições "*in vivo*".

Kawashima e Stashenko⁶⁸, em 1999, verificaram a relação entre a reabsorção óssea e citocinas reguladoras na inflamação periapical induzida em camundongos. A destruição óssea periapical precoce mediada pela IL-1 α em camundongos é conhecida. A produção e ação da IL-1 α é modulada por uma rede de citocinas, as quais são produzidas por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), e células residentes do tecido conjuntivo. Este estudo observou a cinética da expressão de dez citocinas em lesões periapicais induzidas em camundongos. Os resultados indicaram que a rede de citocinas é ativada no periápice em resposta à infecção bacteriana, e que as reações pré-inflamatórias moduladas pelos linfócitos Th1, podem predominar durante a destruição óssea periapical.

Leonardo et al.⁸³, em 1999, avaliaram a liberação de formaldeído por quatro cimentos endodônticos, pois a literatura mostra que alguns cimentos como o Endométhasone e o N2, que contém formaldeído, podem causar necrose tecidual e inflamação, embora lentamente ocorre a reparação. Outros cimentos como o AH26, não contém formaldeído na fórmula, mas através de uma reação química após misturado (envolvendo dois componentes: resina bisfenol A e hexametilenotetramina), ocorre a liberação de formaldeído. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotômetro para verificar a liberação de formaldeído dos cimentos Endomethasone, AH26, AH Plus e Top Seal. Os autores observaram que o AH Plus e o Top Seal liberaram um mínimo de formaldeído, estatisticamente insignificante quando comparado aos demais.

Leonardo et al.⁸⁴, em 1999, avaliaram a resposta tecidual de

um cimento endodôntico à base de resina epoxi, o AH Plus, o qual foi comparado ao Fill Canal (à base de óxido de zinco e eugenol). Trinta e quatro pré-molares de cães foram usados. Depois da instrumentação, os canais radiculares foram obturados com guta-percha e com os cimentos citados, utilizando a técnica da condensação lateral. Após todos os procedimentos histológicos, não observaram células inflamatórias nem áreas de necrose associadas ao cimento AH Plus. Formação de tecido duro apicalmente ao material foi observado em 14 espécies. Já o Fill Canal apresentou uma resposta inflamatória de intensidade moderada na região periapical, principalmente adjacente ao material.

A produção moderada de citocinas, H_2O_2 e NO induzida por bactérias lácticas utilizadas na dieta pode apresentar um efeito benéfico na manutenção do balanço imunológico e aumento da resistência à infecções, sem a indução de efeitos secundários que ocorrem em tratamentos terapêuticos com citocinas. Todavia, pode-se notar que altas concentrações de $TNF-\alpha$, H_2O_2 e NO causam caquexia, agressão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque. Portanto, o controle desses mediadores *in vivo* é muito importante, sendo que uma das vias de controle se dá através de estudos experimentais (Park et al.¹⁰⁷, 1999).

Pascon¹⁰⁸, em 1999, comparou a biocompatibilidade do polímero de mamona [Poliol (P)] com os cimentos AH26 (A), Dentinol (D), Kerr Sealer (K) e Sealapex (S), utilizando os testes iniciais de citotoxicidade os secundários de implante subcutâneo e implante intra-ósseo em cobaias,

recomendados prlos documentos da FDI e ADA/ANSI de número 7405 de 1997. O método "*in vitro*" foi o de liberação de crômio radioativo em cultura de células L929. Os materiais foram experimentados por 4 e 24 horas, recentemente preparados (frescos), 24 e 60 horas após a presa. As células, sem contato com o material, serviram como controle da liberação espontânea. A análise estatística dos resultados mostrou diferenças significantes entre os materiais, os quais foram classificados, por ordem decrescente de toxicidade, em: 4 horas, fresco: K, A, D, S, P; 24 e 60 horas, presa: K, S, P, A, D; 24 horas, fresco: A, D, S, K, P; 24 horas, presa: K, D, S, P, A e 60 horas, presa: K, S, P, A, D. Para o implante subcutâneo foram utilizadas 45 cobaias, as quais receberam quatro implantes dorsais com o mesmo material. A parede externa do tubo serviu como controle. Para o implante intra-ósseo, 84 cobaias receberam um implante de cada lado da sínfase da mandíbula. Corpos vazios e a parede externa do corpo serviram como controle. Após 30, 60 e 90 dias, os animais foram mortos e os espécimes processados para exame histológico de rotina. Os resultados mostraram que todos os materiais, com exceção do Poliol, apresentaram reação inflamatória que variava de moderada a severa em todos os tempos de observação, nos dois testes utilizados. Esses resultados permitiram concluir que, de acordo com os critérios da FDI e ADA/ANSI, o Poliol® foi considerado um material biocompatível, apresentando condições biológicas para sua utilização como material de obturação de canal.

Puricelli et al.¹²⁰, em 1999, realizaram um estudo onde analisaram o comportamento do polímero poliuretano da mamona implantado em leito subperióstico em ângulos mandibulares de ratos. Vinte *Rattus*

novergicus (var. Albinus rodentia mammalia, cepa Wispar) foram divididos em quatro grupos de cinco animais. O polímero poliuretano da mamona, com adição de carbonato de cálcio, foi implantado no bordo inferior da mandíbula dos mesmos. Em cada grupo, um animal correspondeu ao controle, tendo sido submetido à cirurgia sem a colocação do implante. Os animais foram sacrificados após 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Ao exame histológico, em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE), observou-se a estabilidade do implante, a ausência significativa de reação inflamatória, a formação de cápsula fibrosa circunjacente ao implante e neoformação óssea. Segundo as condições experimentais, concluímos que o polímero poliuretano da mamona, implantado em leito subperióstico, não desencadeou reação inflamatória tardia significativa, tendo levado ao desenvolvimento de cápsula fibrosa circunscrita, com evolução para neoformação óssea. Sinais de rejeição, exposição ou expulsão do implante não foram observados.

Citocinas são mediadores químicos solúveis sintetizados e liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário que desempenham papel importante na comunicação intercelular e em processos patofisiológicos. São responsáveis pela modulação da inflamação e imunidade, regulando o crescimento e citodiferenciação de leucócitos e células não leucocitárias. Tais citocinas, geralmente o fator de necrose tumoral (TNF), Interferon (IFN), fator de crescimento epitelial (EGF), interleucinas (IL), fatores estimuladores de colônia (CSF), atuam pela ligação e receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata de eventos que levam à indução, ao favorecimento ou à inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo

genético celular¹⁵⁸. Especificamente para esta investigação, analisou-se a liberação da citocina TNF- α , que possui efeito estimulante no crescimento de fibroblastos, apresenta atividade citotóxica pela indução dos reagentes intermediários do oxigênio (NO) e (H₂O₂), não apenas nos macrófagos e polimorfonucleares, mas também em células cancerígenas, é quimiotático para neutrófilos, adjuvante na proliferação e citodiferenciação de células β humanas, interferindo no processo de citodiferenciação, proliferação celular e atua em sinergia com a interleucina-1 (IL-1), na ativação osteoclástica, associados à liberação de prostaglandina-E₂. Dependendo da quantidade liberada, pode ter efeito deletério ao meio, com aumento de metabolismo celular e perpetuação do processo inflamatório quando liberada em grandes quantidades, ou efeitos que favorecem o processo de isolamento do corpo estranho, citodiferenciando fibroblastos, exacerbando a síntese proteica e colagênica, o que caracteriza reparo pós-obturação com formação de cápsula fibrosa ou em tecido mineralizado, que impede o contato de células leucocitárias com o corpo estranho. Além das citocinas, para a obtenção de energia, e conseqüentemente fagocitose, as mitocôndrias dos macrófagos em contato com os cimentos sofrem "explosão oxidativa" liberando H₂O₂, e pela ativação da "membrana celular" o elemento liberado é o óxido nítrico (NO). Sua função é remover antígenos particulados, processar, apresentar o antígeno às células T (linfócitos T), desencadeando a resposta imune. As citocinas são "proteínas" secretadas por células da imunidade inata e adaptativa. Elas são produzidas em resposta à microrganismos e outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam diversas respostas de células envolvidas na imunidade e na inflamação. Na fase de ativação da resposta imune, as "citocinas"

estimulam o crescimento e a diferenciação de "linfócitos", e nas fases efetoras da imunidade inata e adaptativa, elas ativam diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos. As citocinas também estimulam o desenvolvimento de células hematopoiéticas. Na medicina, as citocinas são importantes agentes terapêuticos ou são considerados como alvos para antagonistas específicos em numerosas doenças imunes e inflamatórias. Dentre as citocinas, o IFN- γ é uma proteína homodimérica produzida por células TH1 CD4+, e células T CD8+. O IFN- γ é a citocina liberada pelos linfócitos T e células NK que ativam o macrófago, destruindo microrganismos fagocitados. O IFN- γ ativa macrófagos e estes macrófagos ativados são capazes de produzir TNF- α , IL-6, IL-12, radicais livres de oxigênio e óxido nítrico. (Roitt et al.¹²⁶, 1999).

Em 1999, Tavano et al.¹⁵², avaliaram a densidade radiográfica (níveis de cinza da imagem radiográfica), em 3 grupos de coelhos por período (15, 30, 90 e 120 dias), realizando-se defeitos nas tíbias dos mesmos, nos quais implantamos polímero derivado da mamona em uma tíbia; e preservamos a outra apenas com o defeito, em cada animal, como controle. Os animais foram sacrificados em diferentes períodos e obtidas imagens radiográficas digitais das peças através da placa de imagem sensibilizada por um aparelho de raios X convencional que foi lida pelo escaner a laser do sistema Digora (Soredex - Finland) utilizando um computador IBM-PC compatível. Avaliamos através deste programa de imagem (Digora for Windows 5.1) a densidade radiográfica das áreas teste e controle em diferentes períodos e comparamos com a radiopacidade subjetiva obtida das radiografias convencionais,

concluindo que a imagem digital oferece boas condições de visualização para realização da interpretação radiográfica. A análise da densidade radiográfica digital demonstrou a evolução e o retardo do processo de reparo, tal como ocorre na avaliação subjetiva da imagem radiográfica, mas permite ao profissional a obtenção de dados numéricos para analisar objetivamente a evolução do reparo ósseo.

Teixeira et al.¹⁵³, em 1999, estudaram a neoformação óssea basal da mandíbula de 40 ratos após preparo de um defeito ósseo obtido com fresa cilindro-cônica e preenchimento ósseo de 20 ratos do grupo experimental com poliuretano vegeral sem CaCO_3 . Os demais 20 ratos, representando o grupo controle, não receberam nenhum tratamento. Decorridos 15, 25, 40 e 60 dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados e suas mandíbulas removidas e coradas com hematoxilina e eosina para o estudo morfológico sob microscopia óptica comum. Os resultados demonstram grande aceitação orgânica à resina. Inicialmente, realizou-se a confecção de dois defeitos ósseos em cada tíbia. No lado direito, um defeito foi implantado com polímero de mamona (grupo PM) e o outro com cimento ósseo (grupo CO). No lado esquerdo, um defeito foi implantado com resina acrílica termicamente ativada (grupo RATA) e o outro foi preenchido apenas por coágulo sangüíneo (grupo Controle). Decorridos 30 dias, 60 e 90 dias, três coelhos de cada grupo foram sacrificados. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10 por cento, processadas e submetidas às análises macroscópica e microscópica através da microscopia de luz. O polímero de mamona, a resina acrílica termicamente ativada e o cimento ósseo foram bem

tolerados pelos tecidos hospedeiros.

Garcia e Rangel⁴⁴, em 2000, avaliaram o processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos realizados na parede anterior do seio maxilar após osteotomia e colocação de implantes de polietileno poroso de alta densidade - Medpor, poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) e matriz óssea desmineralizada bovina. Foram empregados 8 macacos pregos (*Cebus apella*). As análises foram feitas após 145 dias de implantação através de avaliações histológicas e histométricas utilizando método de microscopia óptica computadorizada - Imagelab 98. Os resultados mostraram que o reparo ósseo se estabeleceu em 77,24 por cento da superfície de contato com a matriz óssea bovina, 41,31 por cento com o Medpor e 28,24 por cento do polímero de mamona. Houve prevalência de neoformação conjuntiva (58,5 por cento) no grupo sem implantações. Como conclusões finais podemos afirmar que o melhor comportamento histomorfológico foi da matriz óssea bovina, seguida do polietileno poroso de alta densidade - Medpor e da poliuretana de mamona (*Ricinus communis*), o qual respondeu com intensa fibrose e moderado infiltrado inflamatório crônico tardio.

Metzger⁹⁵, em 2000, numa revisão sobre a presença dos macrófagos nas lesões periapicais, considerou-os a principal fonte das citocinas interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-1 alfa (IL-1 α) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais contribuem para a iniciação e regulação do processo inflamatório, ativando células ou para ação destrutiva como os osteoclastos relacionados à reabsorção óssea ou regulando o processo de

reparo pela ativação dos fibroblastos elevando assim a síntese de colágeno produzido por estas células.

A liberação do TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos em diferentes concentrações, 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL foi avaliada por Perassi¹¹⁰, em 2000. Foram experimentados o Sealapex, Endométhasone e seus respectivos componentes. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio não liberou ou liberou baixas unidades de TNF- α , já o óxido de zinco e eugenol estimulou a liberação de altas quantidades.

Rasquin¹²⁴, em 2000, avaliou a citotoxicidade dos cimentos endodônticos, Sealapex, Sealer 26, Top Seal, Pro Canal e Endométhasone. Sob um leitor de ELISA foram avaliadas as liberações de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio, por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos em contato com soluções de cimentos, nas concentrações de 9 e 18 mg/mL. Para o autor, os resultados permitiram observar maiores liberações de NO com os cimentos Top Seal, Sealer 26 e Endométhasone, em qualquer uma das concentrações. Entre os cimentos Sealapex e Pro Canal, com as menores liberações de NO, parece não haver qualquer diferença significativa dentro das concentrações. Entretanto, na concentração de 9 mg/mL todos os cimentos apresentaram liberações bem menores do que na concentração de 18 mg/mL.

Calixto et al.²¹, em 2001, realizaram um trabalho onde os

objetivos foram: 1) testar a biocompatibilidade de uma resina natural, derivada do óleo de mamona, implantada na cavidade de extração dental de ratos, e 2) estudar a possível interferência do material na cronologia do reparo alveolar. O material (AUG-EX, Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda., Araraquara - SP) foi implantado. Portanto, concluímos que a poliuretana derivada do óleo da mamona apresentou um comportamento favorável à biocompatibilidade.

Cavalieri et al.²⁷, em 2001, realizaram um estudo comparativo das respostas teciduais após a implantação de polímero de mamona, cimento ósseo e resina acrílica termicamente ativada em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados nas tíbias de coelhos, mediante análises macroscópicas através da microscopia de luz. Foram utilizados nove coelhos adultos com peso médio de aproximadamente quatro quilos e divididos em quatro grupos: Polímero de Mamona (PM), Cimento Ósseo (CO), Resina Acrílica termicamente Ativada (RATA) e Controle, não ocorrendo formação de cápsula, tampouco migração local de células inflamatórias.

As células que expressam as moléculas classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal, são reconhecidas como capazes de atuarem como apresentadoras de antígenos. Estas células desempenham função essencial na indução de resposta imune dependente de linfócitos T, pois, reconhecem, processam e apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4+. Assim, no estudo de Kaneko et al.⁶⁵ (2001), lesões periapicais foram induzidas em ratos Wistar, mediante exposição pulpar ao meio bucal. A presença de

células expressando MHC II foi avaliada pela coloração pela imunoperoxidase, utilizando o anticorpo monoclonal OX6+ e a ultraestrutura destas células analisadas pelo microscópio eletrônico. Essas células foram classificadas em dois grandes grupos, macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas foram as mais frequentes nas lesões periapicais. Alguns linfócitos e plasmócitos também apresentaram alguma reatividade. As células macrófagos e células dendríticas OX6+ apresentavam um contato célula-a-célula com linfócitos. Portanto, as células apresentadoras de antígenos desempenham crucial participação no desenvolvimento das lesões periapicais.

Em trabalho de Kim et al.⁷² (2001), estudos prévios mostraram que a substância P (SP) causa vasodilatação na polpa dental. O objetivo deste estudo foi avaliar se o SP trabalha através do caminho do Óxido Nítrico (NO) por influência do escoamento sanguíneo pulpar, e para permitir o conhecimento do mecanismo intracelular do SP na fisiologia pulpovascular. Uma mistura de polpas dentais frescas extraídas de dentes de 5 bovinos foram usadas. Após a maceração pulpar, SP, L-Name e nitropussiato de sódio (SNP), foram adicionadas ao tecido pulpar. Após incubação por um período de 1, 2, 3 ou 4 horas à 37°C e 100% de umidade amostras teciduais foram centrifugadas e o nitrato foi quantificado através de método da Quimioluminescência. Os dados foram analisados por múltiplas comparações estatísticas, empregando-se o teste de ANOVA. Nas concentrações de 0,25, 50 e 100 mg/mL de SP, produziu claramente doses dependentes de Óxido Nítrico para cada nível de SO ($P < 0,05$). Adicionando-se, para cada concentração de SP, a síntese de NO foi efetivamente bloqueada pelo L-Name (95 a 99%). Nós concluímos entretanto

que SP's promove a estimulação da produção de NO no endotélio de maneira independente, isto é a L-Name não tem efeito de inibição na produção de NO pelo SP. Estes resultados provam a evidência que o aparecimento de NO é envolvido na teoria do mecanismo de função da vasodilatação do SP.

O objetivo do estudo de Tai et al.¹⁴⁶, em 2001, foi determinar a citocompatibilidade de três diferentes extratos de cimento de canais radiculares e para comparar a citotoxicidade responsável destes materiais em 2 tipos diferentes de fibroblastos primários de humanos oral (derivados da gengiva e da mucosa bucal) e uma célula linha permanente de hamster (V79 células). A citotoxicidade foi avaliada usando um método ou meio do M.T.T., ou seja, redução do brometo de tetrazólio. Os resultados mostraram que os cimentos obturadores de canais radiculares, AH Plus, Canals e N₂ foram citotóxicos para as culturas primárias de fibroblastos oral humano e para as células V79. Foi achado que N₂ foi o mais citotóxico dos cimentos de canais radiculares entre aqueles cujos foram experimentados em todas as culturas. A citotoxicidade decresceu ou diminuiu, em uma ordem de N₂ > AH Plus = Canals. A sensibilidade da citotoxicidade depende dos materiais experimentados e do sistema de cultura de células utilizados.

Em 2002, Bonini et al.¹⁸ estudaram a poliuretana derivada do óleo da mamona para substituir o tecido ósseo, considerando-se que ela tem demonstrado ser um material biocompatível e barato. O objetivo do presente trabalho foi estudar o tipo, intensidade e duração da resposta inflamatória induzida por esta poliuretana. A suspensão do material na forma calcificada foi

testada em camundongos isogênicos C57/BL/6. Por meio de microscopia de luz observou-se a migração de leucócitos na cavidade peritoneal da suspensão, a qual revelou, inicialmente, o crescimento e predomínio do número de neutrófilos, e subsequente ao decréscimo destes, o predomínio dos mononucleares. E, embora no pulmão e no tecido subcutâneo, após as injeções endovenosa e subcutânea, a cinética de leucócitos tenha sido semelhante a essa, no último, observamos a diferenciação morfológica de macrófagos e o desenvolvimento de granuloma do tipo corpo estranho, portanto concluímos que a Poliuretana derivada do óleo da mamona, apresentou um comportamento favorável a biocompatibilidade.

Com o surgimento de inúmeros cimentos endodônticos e considerando a literatura sobre agressão tecidual provocada pelo extravasamento de cimentos obturadores de canais radiculares para o periápice, propôs-se avaliar, por meio de teste edemogênico, a biocompatibilidade tecidual dos cimentos Endométhasone, Sealapex, Sealer Plus e Sealer 26. O teste edemogênico quantifica o edema frente ao material analisado, verificando entre os cimentos experimentados aquele que apresenta menor resposta tecidual, uma vez que a quantificação do edema, um dos primeiros eventos da inflamação, permite uma comparação da biocompatibilidade tecidual entre eles. Utilizaram 48 ratos machos (Wistar), distribuídos em grupos de seis para cada tempo pós-operatório para cada um dos cimentos, que após a espatulação foram imediatamente injetados no tecido conjuntivo subcutâneo da região dorsal dos animais. Cada cimento foi avaliado em tempos pós-operatórios de três e seis horas. Baseando-se nos resultados

obtidos com auxílio de um espectrofotômetro, pode-se concluir que houve maior quantidade de edema no tempo pós-operatório de três horas em todos os cimentos, o Endométhasone e o Sealer Plus apresentaram reação inflamatória inicial acentuada, mas que diminuiu com o tempo, e, o Sealapex e o Sealer 26 foram os mais biocompatíveis com os tecidos que apresentarem menor índice de exsudato inflamatório, quando comparados com o Endométhasone e Sealer Plus (AU) (Canova et al.²³, 2002).

De acordo com Huang et al.⁵⁹, 2002, os resultados mostraram que os componentes dos cimentos compostos resinosos, cimentos compostos a base de óxido de zinco e eugenol, e cimento composto à base de hidróxido de cálcio foram citotóxico para células primárias do ligamento periodontal, culturas e células V79. O cimento a base de hidróxido de cálcio (Sealapex) foi o que apresentou à menor citotoxicidade entre os cimentos experimentados em ambas as culturas. A citotoxicidade apresentou-se em uma ordem decrescente de N_2 > Endométhasone > AH26 > AH Plus > Canals > Sealapex. Assim os autores concluem que inicialmente o uso de cimentos à base de $Ca(OH)_2$ como material obturador de canais radiculares pode resultar em uma resposta mais favorável aos tecidos periradiculares, embora a sensibilidade citotóxica depende dos materiais a serem experimentados e do sistema celular de culturas usados, devendo passar por outros estágios ou níveis de experimentação. O objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade de três diferentes tipos de cimentos de canais radiculares em células do ligamento periodontal humano e um cimento em linhagem de células de hamster V79. Foram utilizadas sete amostras de dois cimentos compostos resinosos, AH26 e

AH Plus, três cimentos compostos de óxido de zinco e eugenol (Canals, Endométhasone e N₂ e um cimento composto a base de hidróxido de cálcio, o Sealapex foram colocados em meio de cultura por 1, 2, 3 e 7 dias. A citotoxicidade foi avaliada utilizando um meio através da redução do Brometo de Tetrazólio nas células humanas primárias do ligamento periodontal, e nas células do V79 derivado dos hamster chineses.

Jiang e Schilder⁶³ (2002), avaliaram a resposta de monócitos e de células osteoblásticas de camundongos aos produtos celulares oriundos de *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas endodontalis*. Verificaram que os produtos bacterianos induziram em igual intensidade a produção de proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP-1) e para neutrófilos (MIP-2). Interferon- γ foi estimulado apenas por *Streptococcus mutans* que também produziu maior quantidade de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . No entanto, as células osteoblásticas foram mais sensíveis a *Porphyromonas endodontalis* quanto a produção de IL-6, IL-1 β e (MCP-1), mas sem produção MIP-2, TNF- α e IFN- γ . Verificaram também que *Streptococcus mutans* via ativação de monócitos, é um potente estimulador das células osteoblásticas, por meio de mediadores solúveis.

Após este estudo, em 2002, Schwarze et al.¹³¹, determinaram a citotoxicidade de diversos tipos de cimentos do canal radicular "in vitro" sobre o período de 1 ano, usando um modelo novo do teste. As raízes de dentes de humanos foram extraídas e preenchidas com o N₂, o Apexit, o Roekoseal, AH Plus, o Ketac Endo, o Endométhasone, e um cones de guta-percha. Além disso, as raízes foram preenchidas com a guta-percha/N₂

lateralmente condensada. Os dentes preenchidos com um cone de guta-percha somente eram controles. Todos os espécimes foram extraídos consecutivamente com água destilada por um período total de 1 ano. Os extratos foram investigados para a citotoxicidade por fibroblastos 3T3 e fibroblastos do ligamento periodontal humano. Os resultados foram analisados estatisticamente com teste de Dunnett's ($p < 0.05$). Os efeitos citotóxicos pronunciados foram causados somente por extratos de N₂ em ambas as culturas das células ($p < 0.05$). Além disso, as alterações citotóxicas estatisticamente significantes foram induzidas pelas amostras de Endométhasone de 10 semanas ($p < 0.05$). Todos os outros materiais investigados não alteraram significativamente o metabolismo das células.

Schwarze et al.¹³², em 2002, avaliaram a compatibilidade celular de cinco cimentos endodônticos nas primeiras 24 horas após misturá-los. Os espécimes do N₂, do Endométhasone, do Apexit, AH Plus e do Ketac Endo foram extraídos com células de meio de cultura 0, 1, 5 e 24 após misturar. As amostras foram testadas para a citotoxicidade com células 3T3 e fibroblastos do ligamento periodontal humanos usando um ensaio XTT. Os dados foram analisados por meio dos testes de Dunnett's ($p < 0,05$) para encontrar diferenças estatísticas. Os extratos do N₂ inibiram completamente o metabolismo da célula ($p < 0,05$). Os efeitos similares foram provocados pelas primeiras três amostras de Endométhasone, mas o extrato das 24-h significativamente irritou mais células ($p < 0,05$). A citotoxicidade severa foi observada em todos os extratos de Ketac Endo ($p < 0,05$). Uma inibição significativa da atividade mitocondrial foi induzida pelo primeiro (3T3) ou

primeiro e segunda amostra (fibroblastos do ligamento periodontal) do AH Plus ($p < 0.05$). As subseqüentes amostras destes cimentos endodôntico e todos os extratos de Apexit não revelaram nenhum potencial de citotoxicidade.

De acordo com Carlos et al.²⁴, 2003, o papel componente da parede celular na resposta imune ao *Sporothrix schenckii* não é conhecida. O efeito dos componentes da parede celular e o exoantígeno obtido do *Sporothrix schenckii* na interação macrófagos e fungos foi analisada com relação ao NO (óxido nítrico) e Fator de Necrose Tumoral- α . Os componentes lipídicos da parede celular desenvolve um importante papel na patogenicidade das micoses e foi encontrado para inibir o processo da fagocitose e para induzir alta liberações de NO e TNF- α em culturas de macrófagos no presente estudo. Estes resultados é muito interessante porque é o primeiro relato sobre um componente do fungo *S. schenckii* que apresenta esta atividade.

Chierice²⁸ (2003), do grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Universidade de São Paulo, campus São Carlos, em 1984, desenvolveu um novo polioliol derivado de polímero da mamona fornecendo algumas informações sobre o material. "A mamona (*Ricinus communis*, da classe da Dicotiledónea, Ordem Genareaces e família Euforbaceaes) constitui um vegetal típico de clima tropical e, o Brasil, devido às suas características climáticas e por sua grande extensão territorial, apresenta-se como uma das grandes reservas mundiais desse produto. A mamona possui um grande potencial óleoquímico, podendo garantir o fornecimento de polímeros e pre-polímeros a partir de ácidos graxos em larga escala. O óleo de mamona,

também conhecido como óleo de rícino, é um produto de ordem vegetal contendo, em sua composição, de 81 a 96% de triglicerídeo do ácido ricinoléico, podendo ser considerado um poliol natural por conter 3 radicais hidroxilas passíveis de serem utilizados na síntese de poliuretanas.

O objetivo deste estudo foi comparar a citotoxicidade de cimentos obturadores de canal radicular à base de fosfato de cálcio (selador de raiz Apatita (ARS) Tipo I, II, III) com outros quatro seladores endodônticos (selador de canal pulpar EWT, AH Plus, Sealapex, Ketac Endo). Os extratos seladores foram obtidos em meios de cultura após a mistura dos cimentos durante os sete seguintes períodos: 1 h (0 - 1 h), 8 h (1 h - 8 h), 24 h (8 h - 24 h), 48 h (24 h - 48 h), 1 semana (48 h - 1 semana), 2 semanas (1 - 2 semanas), 4 semanas (2 - 4 semanas). Fibroblastos L929 de rato foram expostos à cada extrato cimento e os efeitos citotóxicos foram avaliados usando o método M.T.T. e a análise neutra vermelha (NR). Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste Kruskal-Wallis, Friedman's 2-way ANOVA. Os tipos ARS I, II, III mostraram citotoxicidade muito baixa em todos os períodos de observação em ambas as análises. Não houve diferença significativa entre a citotoxicidade dos tipos ARS I, II, III em cada intervalo de tempo ($p > 0,05$). Os tipos AH Plus e Ketac Endo induziram uma citotoxicidade severa inicial, mas uma baixa citotoxicidade após 8 h (AH Plus) e após 24 h (Ketac Endo). O cimento de canal pulpar EWT e o Sealapex mostraram uma citotoxicidade longa que durou até 4 semanas. Na maioria dos casos, os efeitos citotóxicos de cada amostra dos cimentos mostraram padrões semelhantes entre a análise M.T.T. e a análise NR. Estes achados indicam que o Tipo ARS I, II, III são materiais

muito biocompatíveis e os cimentos de canal radicular à base de fosfato de cálcio precisam de mais avaliação e desenvolvimento (Kin et al.⁷³, 2003).

De acordo com Zhang et al.¹⁶⁸, 2003, prévios estudos tem mostrado que MTAD (uma mistura de isômero de tetraciclina, um ácido e um detergente) é um efetivo irrigante antibacteriano na irrigação final dos canais radiculares, para remover o "smear layer" para superfície proveniente da instrumentação dos canais radiculares. Neste trabalho, foi observada a citotoxicidade do MTDA comparada com os irrigantes usados comumente e medicações. Fibroblastos L929, foram cultivados o seu crescimento em placas de cultura e foram colocados em contato com várias concentrações dos medicamentos e soluções irrigantes experimentadas. A citotoxicidade desses materiais foram avaliadas 24 horas após a microtração usando o método do M.T.T. tetrazólio médias e desvios da standardização de absorbância foram calculados para cada grupo e analisado estatisticamente para determinar a presença ou ausência de diferenças significantes entre as médias. Valores de doses inibitórias a 50% foram calculadas, ordenadas e analisadas estatisticamente usando um indicador de intervalo mediano. Baseados em nossos resultados foi observado que MTDA é menos citotóxico que o eugenol, do que H₂O₂ a 3%, pasta de Ca(OH)₂, que NaOCl a 5,25%, Peridex, e o EDTA, e mais citotóxico do que 2,63%, 1,3% e 0,66% de NaOCl. Dessa maneira a questão de resultados "in vitro" destes experimentos precisam ser melhores estudados e serve como uma etapa ou "ferramenta" para avaliação na "biocompatibilidade" de materiais experimentados em outros níveis de pesquisa. Estudos clínicos futuros são necessários para determinar a sua

aplicação com segurança e eficácia do MTAD como solução irrigadora final para remoção do "smear layer" e para desinfecção dos canais radiculares.

Gutiérrez⁵⁴ (2004), após a adequação de concentrações de citotoxicidade de quatro cimentos testados pelo método de Mosmann¹⁰¹, avaliou-se as mesmas quanto a liberação de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. Concluiu-se, então que as concentrações endodônticas que liberaram NO foram respectivamente, o Endométhasone, seguido do EndoRez, Bálsamo do Peru e de Polímero da Mamona. Estes níveis de liberação de NO estão bem abaixo em relação a citotoxicidade do controle positivo LPS, e muito próximos do controle negativo utilizado, o PEG (Polietilenoglicol 400).

Proposição

Avaliar a liberação de Peróxido de Hidrogênio e Óxido Nítrico em células do exsudato peritoneal de camundongos "Swiss" machos. Para tanto inicialmente serão testadas várias concentrações dos diferentes cimentos quanto à citotoxicidade, e posteriormente realizados os testes para determinação de Peróxido de Hidrogênio e Óxido Nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos "swiss" machos.

Material e método

▪ Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 16 de junho de 2003, tendo sido aprovado em 24 de junho de 2003, através do Ofício CEEA-FOAr nº 21/2003 e seu relatório final ser apresentado em março de 2004.

▪ Cimentos endodônticos

Foram utilizados os seguintes cimentos endodônticos: EndoFill (Dentsply), Sealapex (Kerr) e o cimento experimental da resina poliuretana derivada da mamona o Polifil® acrescido de óxido de zinco (S.S.White) como agente radiopacificador, obtidos através da adição de polietileno glicol 400, na concentração de 9 mg/mL e 18 mg/mL (Perassi et al.¹¹¹).

As obtenções das soluções foram feitas após fracionamento e pulverização dos cimentos pós-presa, pesados em uma balança de precisão (Metler AJ150, da Metler-Toledo AG, USA) em um sonificador (Sonic e Materials, Vibra Cell*), e posteriormente diluídos em polietilenoglicol 400 e esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C. A partir destas concentrações se realizaram diversas diluições em RPMI 1640-Completo, avaliando-se assim sua citotoxicidade em culturas de macrófagos peritoneais

* Sonic & Materials Inc. Danbury, CT. USA

(Mosmann¹⁰¹, 1983).

▪ Preparo dos cimentos endodônticos

Os cimentos experimentados foram espatulados de acordo com as normas dos fabricante e da seguinte forma, com exceção do Polifil®:

- **Cimento Sealapex:** por ser cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocados em partes iguais (6 cm) de pasta de base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro, e com auxílio de uma espátula metálica nº 24, incorporou-se um ao outro até obter-se uma mistura homogênea. As placas contendo o cimento já preparado foram armazenadas por 48 horas em cubas metálicas, deixando-se as tampas entreabertas. Junto as placas, dentro das cubas foram colocadas gases umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.
- **Endofill:** por ser cimento do tipo pó/líquido, utilizou-se a proporção recomendada, em uma quantidade aproximada de 2,8 g de pó para 1 mL de líquido (Leal⁷⁹, 1966) sendo que a mistura foi espatulada vigorosamente com uma espátula metálica nº 24 por toda a placa de vidro, triturando-se os cristais do pó, até atingirmos consistência clínica ideal e homogênea, ao ponto que ao levantar-se a espátula com cimento formava-se um fio com altura aproximada de 2 cm sem que houvesse o seu rompimento. A placa contendo o cimento já preparado foi armazenada por 48 horas em uma cuba metálica, deixando-se a tampa entreaberta. Junto a placa, dentro da cuba

foram colocadas compressas de gazes umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.

- **Cimento Experimental Polifil[®]:** Seringa A - mistura compreende 80 gotas de Poliol = 1 mL de Poliol com 2,75 gramas de óxido de zinco. Seringa B - pré-polímero = 80 gotas. A mistura foi espatulada vigorosamente com uma espátula metálica nº 24 por toda a placa de vidro, triturando-se os cristais do pó do OZ, por um tempo de trabalho de 10 minutos, até atingirmos consistência clínica ideal e homogênea, ao ponto que ao levantar-se a espátula com cimento formava-se um fio com altura aproximada de 2 cm sem que houvesse o seu rompimento. A placa contendo o cimento já preparado foi armazenada por 48 horas em uma cuba metálica, deixando-se a tampa entreaberta. Junto a placa, dentro da cuba foram colocadas compressas de gazes umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material¹¹¹. Esta técnica preconizada de acordo com orientação de Bonetti Filho*.

▪ Animais

Foram utilizados 20 camundongos "Swiss" machos, pesando entre 18 e 25 gramas, do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, com condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), recebendo ração balanceada e água "ad libitum". A

* Comunicação pessoal, 2004.

morte dos animais foi realizada separadamente, para todos os experimentos, por profusão anestésica, nas gaiolas, através da droga Hidrato de Cloral a 10%, utilizando uma sobredose de 0,7mg/mL para cada 100g de peso por animal. Estes procedimentos baseiam-se nas orientações do "Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentacion" (Olfert et al.¹⁰⁴, 1998).

▪ Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente inoculados por via intraperitoneal com 3,0mL de Tioglicolato de sódio (DIFCO) à 3% para estimulação e ativação dos macrófagos. Após 3 a 4 dias os camundongos foram mortos como descrito anteriormente. Cada camundongo foi colocado em um suporte onde ficaram imobilizadas pela patas com o abdômen voltado para cima. Após a anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado a 0,3%, fez-se um corte com uma tesoura de ponta fina, tamanho 14 cm (Quinelato-Brasil), esterilizadas, de comprimento aproximadamente de 2 cm e depois a pele é distendida suavemente com auxílio de duas pinças também esterilizadas (Quinelato-Brasil). Exposto o peritônio inoculou-se 5,0 mL de solução PBS (solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2) estéril, realizando suave massagem manual no peritônio com algodão esterilizado.

As células foram colhidas do peritônio com seringas descartáveis estéreis (B.D.Plastipak®), centrifugadas e lavadas três vezes com PBS e dispensadas em tubo cônico estéril para o preparo da suspensão celular. Após a última lavagem das células do exsudato peritoneal e depois de centrifugado por 3 à 4 vezes a 2000 RPM por minuto em centrífuga (FANEM), a suspensão celular foi ressuspensa em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640-

Completo (Sigma) sendo removidos 10 μ L da suspensão contendo as células e acrescentado 90 μ L de Líquido de Lázarus levando para a contagem do número de células em Câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e ajustada a concentração ideal para cada teste.

▪ M.T.T. - tetrazólio - Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Foi preparada uma solução estoque de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma cod. M- 2128) a 5 mg/mL, em PBS, estocada no escuro a 4°C, esterilizada em membrana tipo Millipore 0,22 μ no momento do uso à 1/5 mg/mL e diluída em meio RPMI 1640-Completo sem soro fetal bovino. Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade que têm as células viáveis tem de clivar o anel tetrazólico presente no M.T.T. (brometo de 3-4, 5-dimetiltiazol-2-il) - 2, 5-difeniltetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (Mosman¹⁰¹, 1983).

A suspensão de células peritoneais utilizada foi ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI 1640-Completo (Mosmann¹⁰¹, 1983). Foram adicionadas várias concentrações dos diferentes cimentos sobre as células. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados sobre a cultura celular 100 μ L de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (M.T.T.) (Across Organics) diluído em tampão de PBS (1 mg/mL). Após incubação de mais 3 horas, à 37°C, descarta-se os sobrenadantes, vertendo-se a placa em papel absorvente e nas

células ou tapete celular aderente coloca-se 100 µL de álcool 2-propanolol/"wells" (Mallinckrodt, Xalostoc, México). Após 10 minutos para estabilização da reação e também para que a quantidade de álcool 2-propanolol usada possa solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura procedeu-se à espectrorotômetro UV/visível a 540nm com filtro de referência a 620nm (Mosmann¹⁰¹, 1983).

- Quantificação dos compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio

- Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess com NaNO₂ como padrão (Green et al.⁵⁰, 1982). Às culturas celulares obtidas dos animais foram acrescentados os diferentes cimentos endodônticos. A suspensão celular foi ajustada à 5x10⁶ células/mL em meio de RPMI 1640-Completo (Sigma), penicilina, estreptomicina, glutamina, ZME e soro fetal bovino e foram distribuídos 100 µL dessa suspensão celular em placas de cultura de 96 cavidades estéreis (Corning Inc.). Em algumas cavidades da placa de cultura, foram adicionados 100 µL da solução de LPS obtido da *Escherichia coli* OZE:B6 (Difco) a 10 µg/mL como agente estimulante (controle positivo). Em outras cavidades/"wells", foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640-Completo à suspensão celular, como controle de células (controle negativo) e em outras ainda 100 µL das diferentes concentrações dos cimentos

estudados sendo incubada. A placa assim constituída foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de CO₂ (5%). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 µL de cada amostra, passadas para uma outra placa e adicionados mais 50 µL/cavidade de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) com filtro de 540nm. As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI 1640-Completo (Sigma). Os testes foram realizados em triplicata de 5 animais diferentes e os valores foram expressos em micromoles de NO/5x10⁵ células.

- **Determinação de liberação de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)**

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari¹¹⁵, em 1980, e adaptado por Pick e Mizel¹¹⁶, em 1981. Os animais foram mortos conforme descrito anteriormente. A suspensão celular foi ajustada à 2x10⁶ células/mL e ressuspensa ao volume em solução completa de vermelho de fenol, contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL, SIGMA). Alíquotas de 100 µL dessa suspensão celular foram transferidas para microplacas de 96 cavidades. Em algumas cavidades da placa foram adicionados 50 µL de uma solução a 5 mg/mL de Zimosan A (de *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA Chem. Co., St.

Louis, MO) em tampão vermelho de fenol, e em outras cavidades foram feitos controle de células (controle negativo), contendo somente a suspensão celular em solução completa de vermelho de fenol e, em outras cavidades ainda foram acrescentados os diferentes cimentos endodônticos. As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa à 37°C com 5% de CO₂ sendo a reação interrompida com a adição de 50 µl/cavidade de NaOH 5N (Sigma). Os resultados foram expressos em "nanomols" de H₂O₂ / 2x10⁶ células, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho de fenol.

▪ Estatística

A análise estatística dos resultados foi feita por intermédio do programa estatístico Graph Pad Instat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para p<0,05, através de comparações múltiplas pelo teste de Tuckey.

Resultado

Endofill

Os resultados obtidos no teste de viabilidade das células do exsudato peritoneal em presença do cimento Endofill nas concentrações de 140 $\mu\text{l/mL}$, 70 $\mu\text{l/mL}$, 35 $\mu\text{l/mL}$ e 17 $\mu\text{l/mL}$ está representado na Figura 1A.

A maior viabilidade foi constatada na concentração de 70 $\mu\text{l/mL}$ quando comparada com os respectivos controles, $p < 0,05$.

A maior liberação de NO na presença desse cimento (Figura 1B) foi observada na concentração de 35 $\mu\text{l/mL}$, com diferença estatisticamente significativa quando comparada com a concentração de 140 $\mu\text{l/mL}$, com $p < 0,05$.

A concentração de 140 $\mu\text{l/mL}$ do cimento apresentou maior liberação de H_2O_2 com diferença estatisticamente significativa com $p < 0,001$, quando comparada com as outras respectivas concentrações (Figura e Tabela 1C).

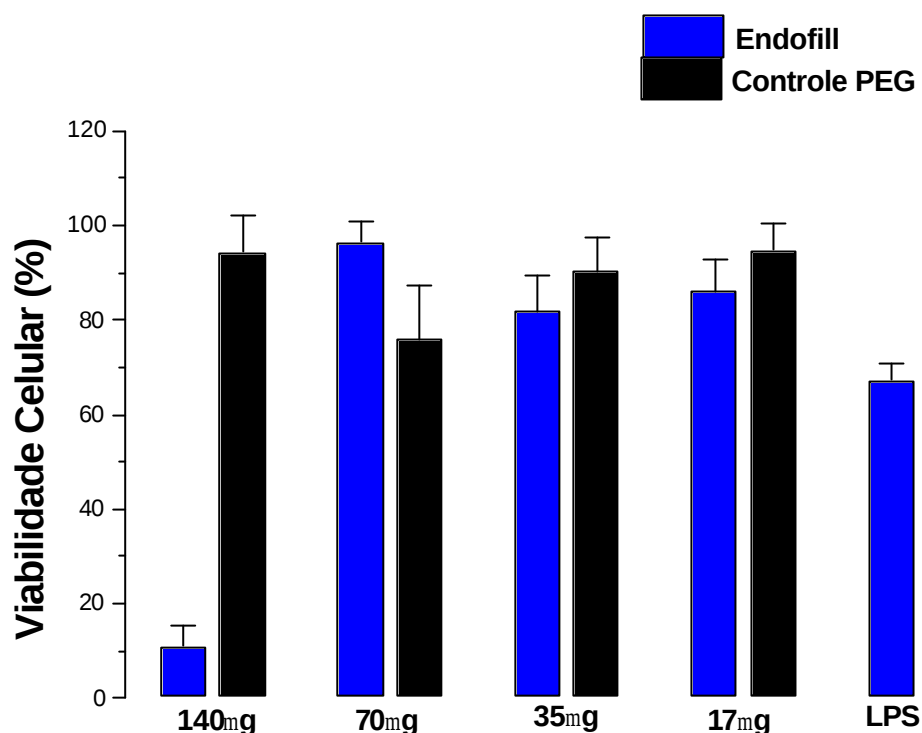


Figura 1A - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações do Endofill. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Endofill nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média ± desvio padrão.

Tabela 1A - Média e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações do cimento Endofill

Viabilidade Celular - Endofill			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill 140 µg	5	10.500	± 3.109
Endofill 70 µg	5	99.000	± 4.468
Endofill 35 µg	5	81.750	± 7.500
Endofill 17 µg	5	86.500	± 2.240
LPS	5	69.750	± 4.785
Poli 0,78%	5	95.750	± 4.250
Poli 0,39%	5	78.500	± 6.764
Poli 0,19%	5	80.250	± 8.230
Poli 0,098%	5	91.250	± 3.591

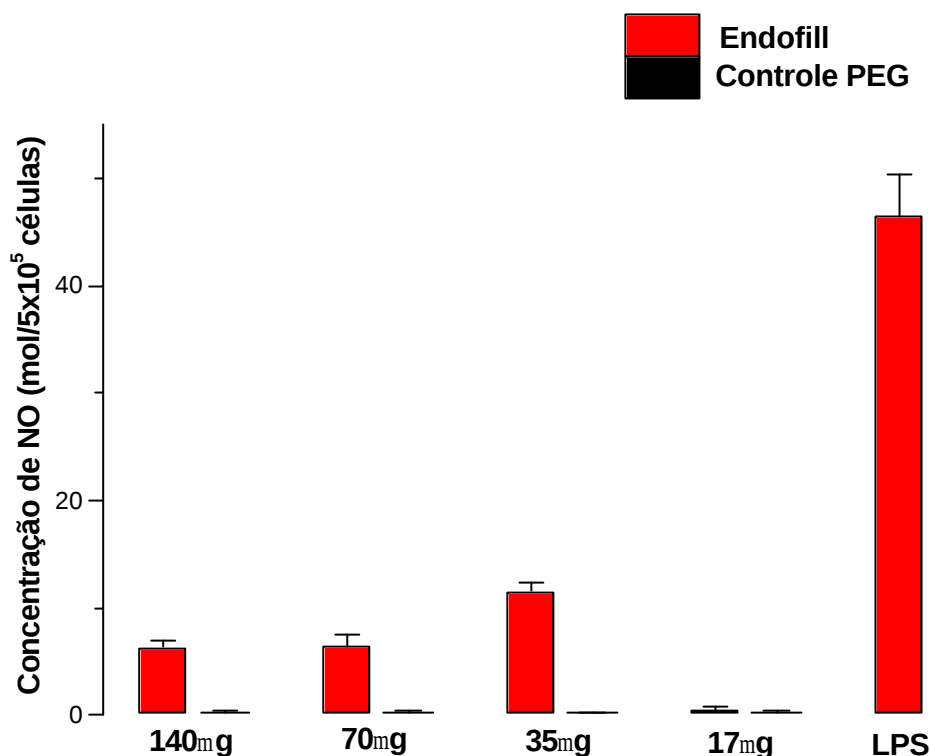


Figura 1B - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Endofill. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Endofill nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵células, como média ± desvio padrão.

Tabela 1B - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de diferentes concentrações de Endofill

Produção de NO - Endofill			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill 140 µg	5	6.686	± 2.918
Endofill 70 µg	5	7.176	± 3.603
Endofill 35 µg	5	11.900	± 1.129
Endofill 17 µg	5	0.3880	± 2.081
LPS	5	43.345	± 8.398
Poli 0,78%	5	0.2340	± 0.5871
Poli 0,39%	5	0.2700	± 0.5971
Poli 0,19%	5	0.1720	± 0.4925
Poli 0,098%	5	0.1640	± 0.4273

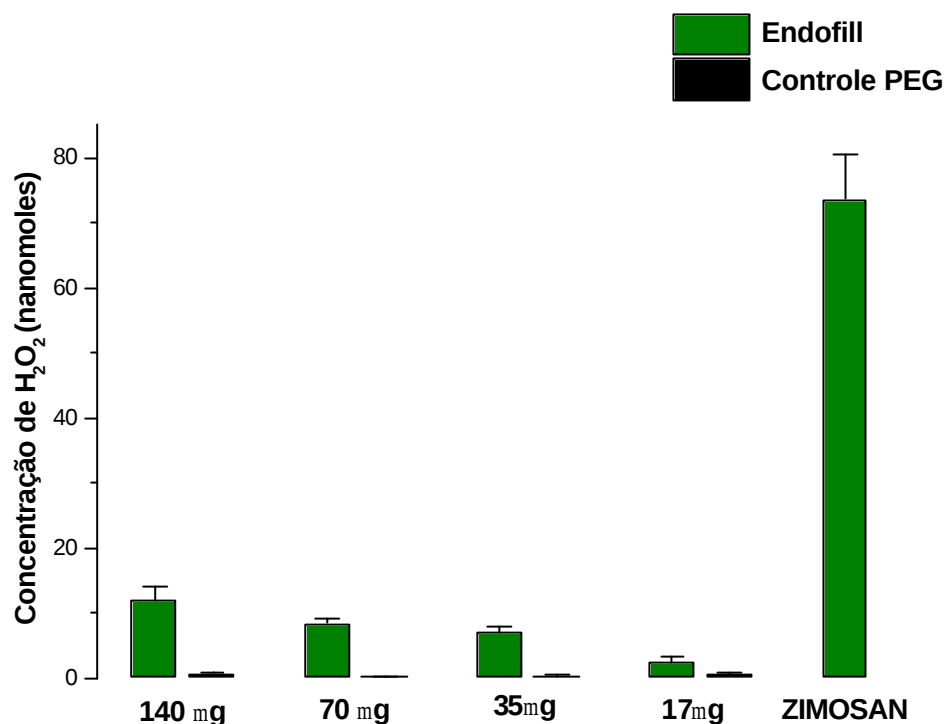


Figura 1C - Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Endofill. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Endofill nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. A concentração de H₂O₂ foi determinada através de uma reta padrão previamente estabelecida, como média ± desvio padrão.

Tabela 1C - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de diferentes concentrações de Sealapex

Peróxido de Hidrogênio - Endofill			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill 140 µg	5	11.672	± 3.220
Endofill 70 µg	5	5.872	± 1.900
Endofill 35 µg	5	3.426	± 1.149
Endofill 17 µg	5	2.658	± 1.107
Zimosan	5	115.30	± 6.456
Poli 0,78%	5	0.8800	± 0.8099
Poli 0,39%	5	0.7400	± 0.5793
Poli 0,19%	5	0.9920	± 0.6565
Poli 0,098%	5	0.8260	± 0.5060

Polímero de Mamona (Polifil)

O teste da viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos na presença do polímero de mamona nas concentrações de 35 $\mu\text{L/mL}$ e 17 $\mu\text{L/mL}$, apresentaram as maiores viabilidades, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações e seus respectivos controles.

Foi observado um aumento significativo de NO na concentração de 17 $\mu\text{L/mL}$ (Figura 2B), comparando com as outras concentrações testadas, $p < 0,001$. Assim, a concentração de 17 $\mu\text{L/mL}$ foi considerada ideal pelos resultados apresentados nos testes de viabilidade celular (Figura 2A) e liberação de NO.

A concentração de 140 $\mu\text{L/mL}$ apresentou maior liberação de H_2O_2 , com $p < 0,05$ comparando-se com 70 $\mu\text{L/mL}$ e 35 $\mu\text{L/mL}$ e $p < 0,001$ comparando com 17 $\mu\text{L/mL}$.

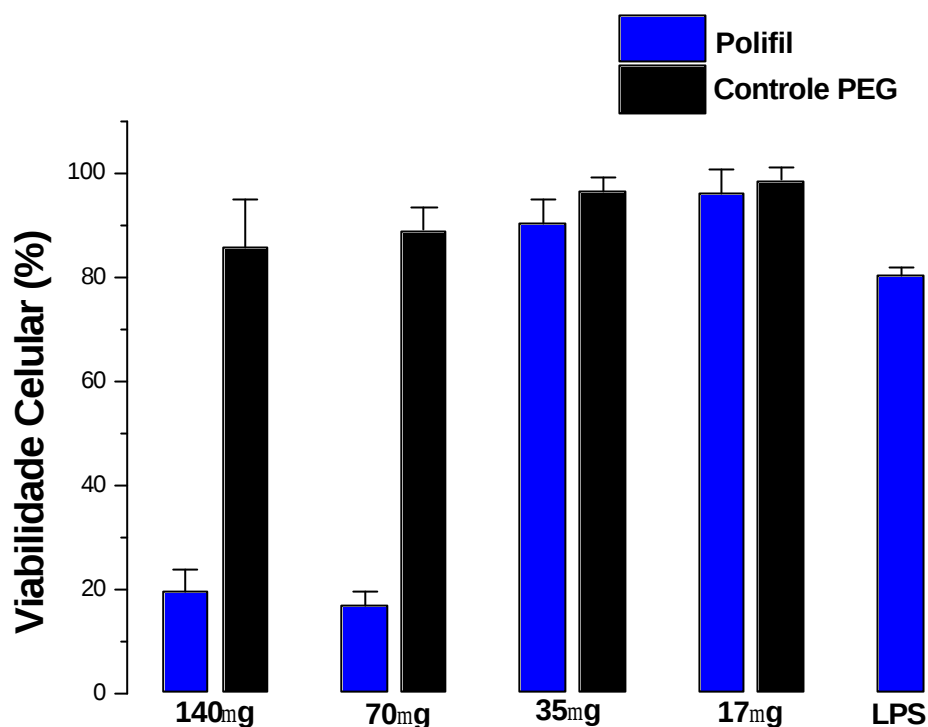


Figura 2A - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações do Polifil. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Mamona nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média ± desvio padrão.

Tabela 2A - Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações do cimento de Polifil

Viabilidade Celular - Polifil			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Polifil 140 µg	5	18.600	± 4.722
Polifil 70 µg	5	17.000	± 4.690
Polifil 35 µg	5	85.200	± 3.059
Polifil 17 µg	5	92.000	± 7.464
LPS	5	80.200	± 2.130
Poli 0,78%	5	84.200	± 6.223
Poli 0,39%	5	88.400	± 6.149
Poli 0,19%	5	83.600	± 2.744
Poli 0,098%	5	81.000	± 3.990

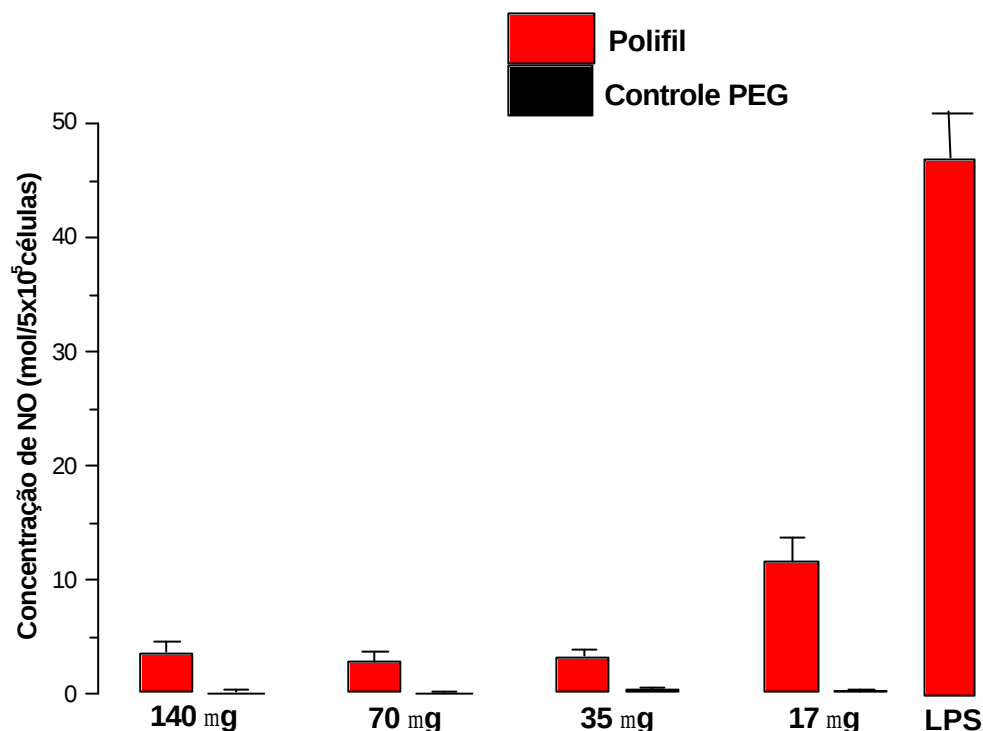


Figura 2B - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Polifil. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Polifil nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 2B - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de diferentes concentrações de Polifil

Produção de NO - Polifil			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Polifil 140 µg	5	3.106	± 1.406
Polifil 70 µg	5	2.840	± 1.251
Polifil 35 µg	5	4.746	± 3.676
Polifil 17 µg	5	12.452	± 2.991
LPS	5	46.622	± 4.844
Poli 0,78%	5	0.8080	± 0.5019
Poli 0,39%	5	0.6440	± 0.6410
Poli 0,19%	5	0.5320	± 0.6715
Poli 0,098%	5	0.432	± 0.6484

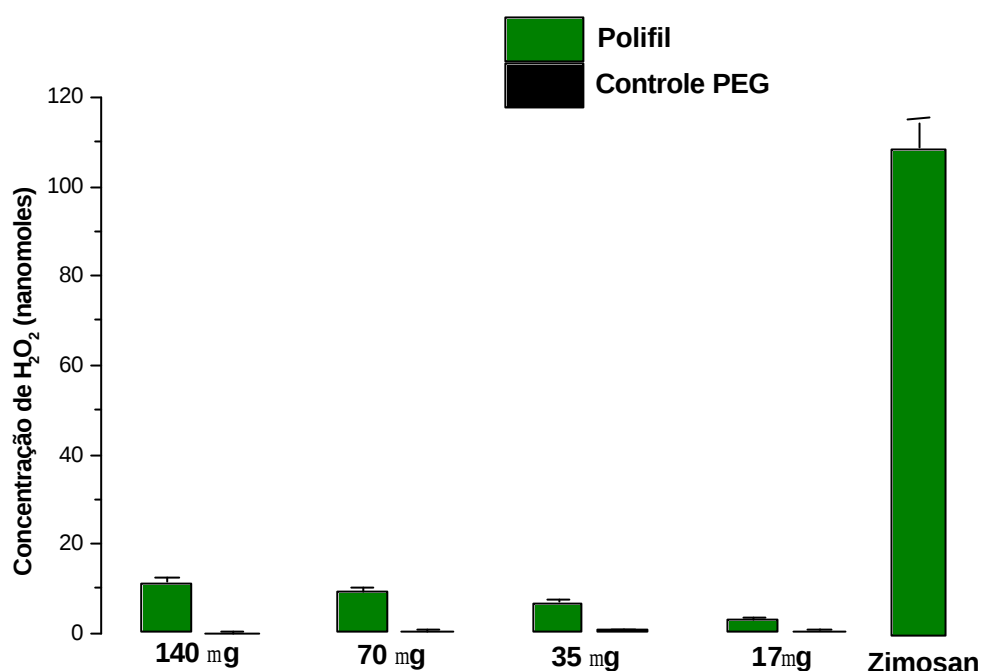


Figura 2C - Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Polifil. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Polifil nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. A concentração de H₂O₂ foi determinada através de uma reta padrão previamente estabelecida ,como média ± desvio padrão.

Tabela 2C - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de diferentes concentrações de Polifil

Peróxido de Hidrogênio - Polifil			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Polifil 140 µg	5	13.954	± 7.857
Polifil 70 µg	5	10.458	± 1.360
Polifil 35 µg	5	7.802	± 1.143
Polifil 17 µg	5	3.650	± 1.738
Zimosan	5	115.40	± 9.720
Poli 0,78%	5	0.2600	± 0.2778
Poli 0,39%	5	0.4420	± 0.3361
Poli 0,19%	5	0.4620	± 0.3355
Poli 0,098%	5	0.6580	± 0.3879

Sealapex

A viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença do cimento Sealapex foi empregado com a finalidade de verificar a condição celular nas concentrações de 140 $\mu\text{l/mL}$, 70 $\mu\text{l/mL}$, 35 $\mu\text{l/mL}$ e 17 $\mu\text{l/mL}$ representada na Figura 3A.

Nas células tratadas com a concentração de 70 $\mu\text{l/mL}$, observou-se a maior viabilidade sem diferença estatisticamente significativa quando comparada com seu respectivo controle ($p > 0,05$).

Quanto a produção de óxido nítrico, Figura 3B, houve maior liberação em presença do sealapex na concentração de 140 $\mu\text{l/mL}$, estatisticamente significativa quando comparada as outras concentrações testadas desse composto, com $p < 0,001$.

O teste de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentou maior liberação na concentração de 140 $\mu\text{l/mL}$, $p < 0,01$, comparando com as concentrações de 35 $\mu\text{l/mL}$ e 17 $\mu\text{l/mL}$ (Figura e Tabela 3C).

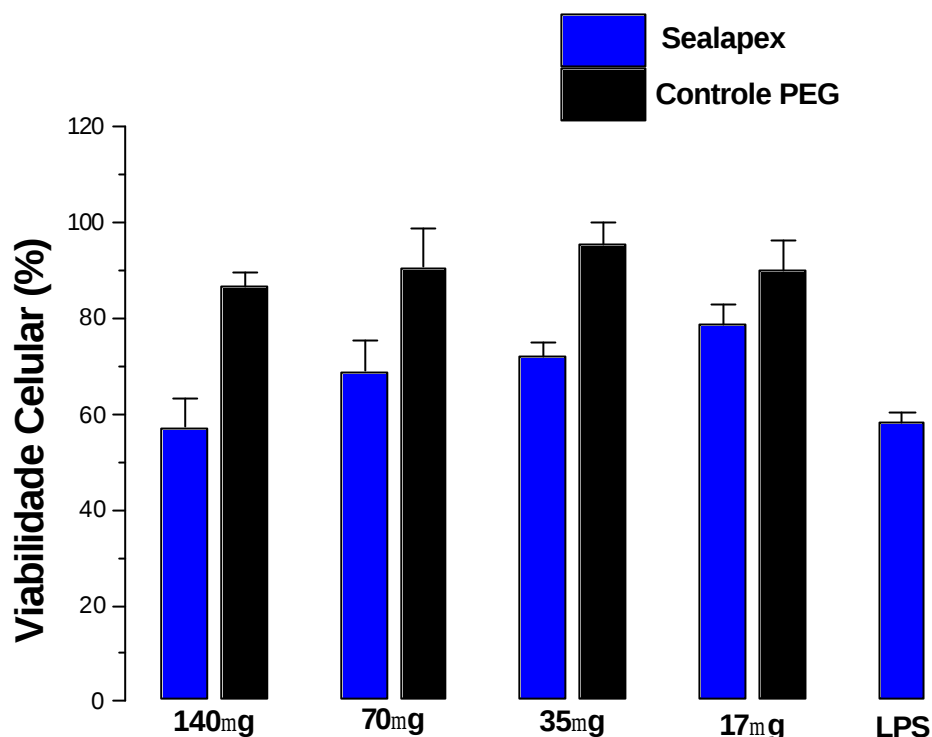


Figura 3A - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações do Sealapex. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Sealapex nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 3A - Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações do Sealapex

Viabilidade Celular - Sealapex			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Sealapex 140 µg	5	57.250	$\pm$ 9.589
Sealapex 70 µg	5	70.750	$\pm$ 6.641
Sealapex 35 µg	5	75.000	$\pm$ 7.301
Sealapex 17 µg	5	79.250	$\pm$ 9.956
LPS	5	58.750	$\pm$ 9.430
Poli 0,78%	5	86.250	$\pm$ 8.500
Poli 0,39%	5	85.000	$\pm$ 8.565
Poli 0,19%	5	92.750	$\pm$ 7.274
Poli 0,098%	5	92.250	$\pm$ 8.180

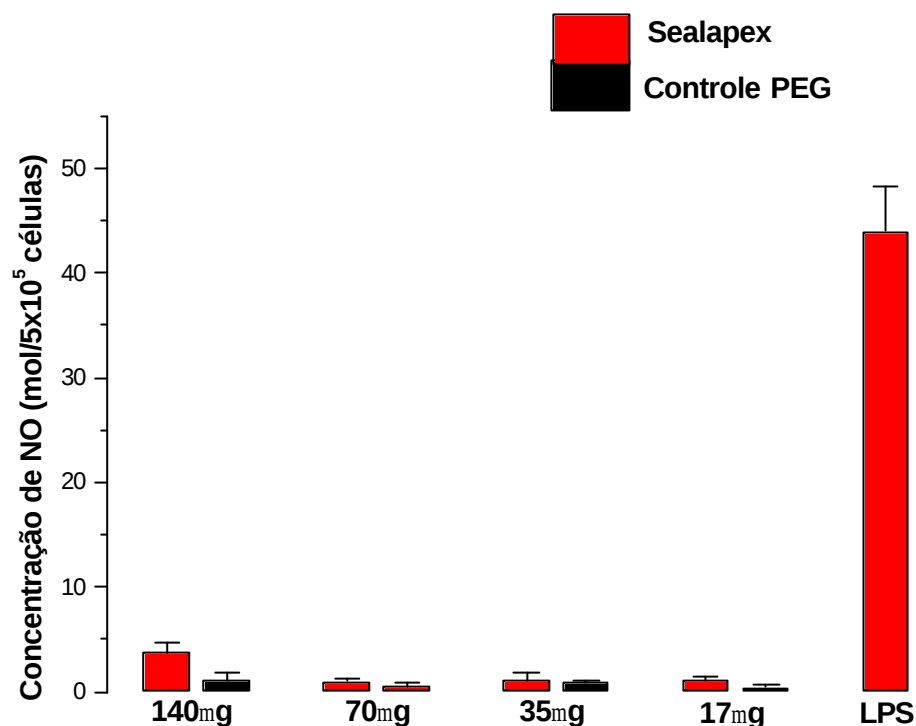


Figura 3B - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Sealapex. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Sealapex nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 3B - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de diferentes concentrações de Sealapex

Produção de NO - Sealapex			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Sealapex 140 µg	5	2.452	± 2.918
Sealapex 70 µg	5	0.9300	± 3.603
Sealapex 35 µg	5	0.3080	± 1.129
Sealapex 17 µg	5	0.1520	± 2.081
LPS	5	47.264	± 8.398
Poli 0,78%	5	0.6800	± 0.6851
Poli 0,39%	5	0.4240	± 0.6072
Poli 0,19%	5	0.2920	± 0.3925
Poli 0,098%	5	0.3125	± 0.4574

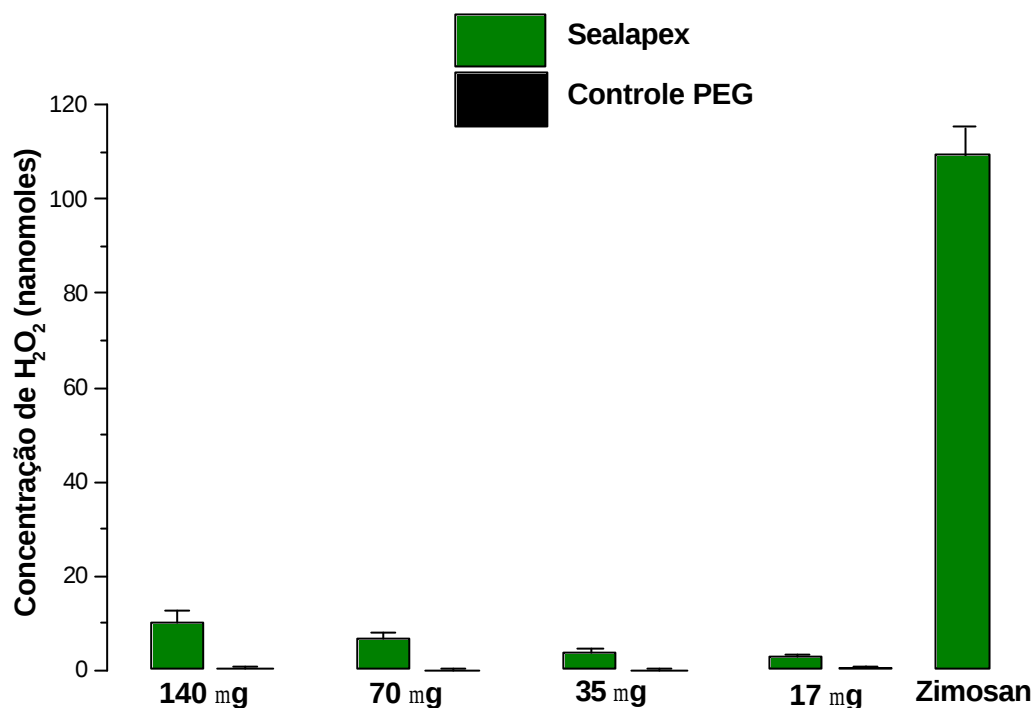


Figura 3C - Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Sealapex. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Sealapex nas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI contendo 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG respectivamente como controle. A concentração de H₂O₂ foi determinada através de uma reta padrão previamente estabelecida, como média ± desvio padrão.

Tabela 3C - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de diferentes concentrações de Sealapex

Peróxido de Hidrogênio - Sealapex			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Sealapex 140 µg	5	10.398	± 2.362
Sealapex 70 µg	5	6.672	± 1.495
Sealapex 35 µg	5	3.774	± 1.149
Sealapex 17 µg	5	2.894	± 1.810
Zimosan	5	115.30	± 6.456
Poli 0,78%	5	0.526	± 0.255
Poli 0,39%	5	0.124	± 0.103
Poli 0,19%	5	0.098	± 0.0993
Poli 0,098%	5	0.776	± 0.2130

Determinação da Produção de Óxido Nítrico

Estabelecidas as concentrações de cada um dos cimentos testados, foi feita a dosagem de NO liberado pelas culturas celulares em presença das amostras LPS (controle positivo) e de somente meio RPMI-C e polietilenoglicol (PEG) com controle de células da reação de Griess.

Os resultados obtidos estão representados na tabela e Figura 5.

A produção de NO pelas células estimuladas pelos cimentos comparadas às células estimuladas com LPS, mostrou uma produção de NO estatisticamente maior para o LPS, com $p < 0,001$.

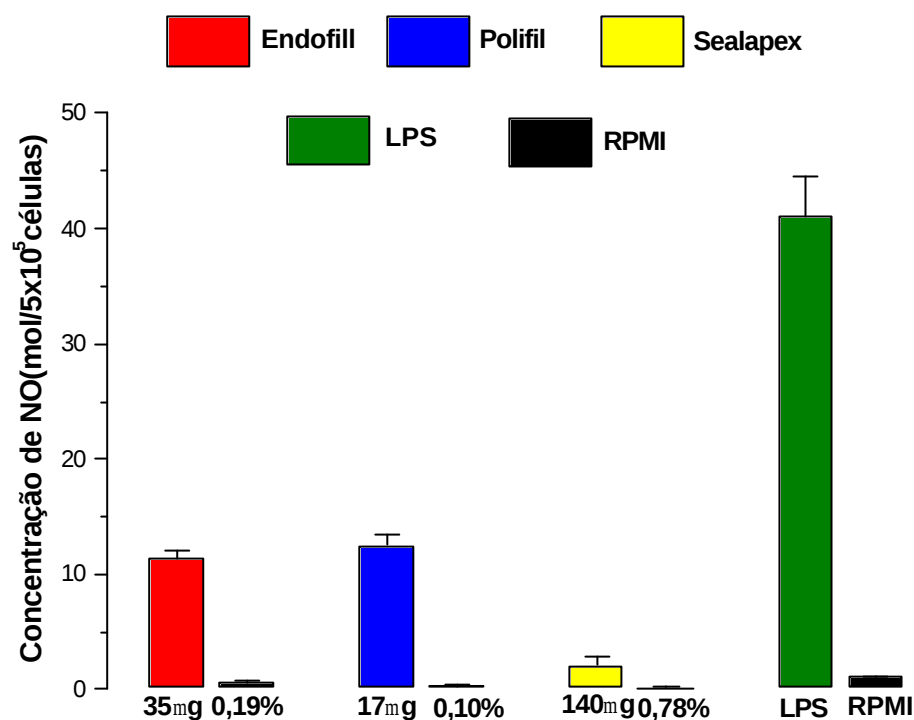


Figura 4 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Endofill, Polifil, Sealapex e LPS (controle positivo) nas concentrações de 140 µg/mL, 17 µg/mL, 140 µg/mL e 17 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,19%, 0,10% e 0,78% de PEG como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de diferentes concentrações dos cimentos testados

Óxido Nítrico - Cimentos			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill 35 µg	5	11.900	± 1.129
Polifil 17 µg	5	12.452	± 2.991
Sealapex 140 µg	5	2.452	± 2.918
LPS	5	43,696	± 5,6163
Poli 0,19%	5	0,604	± 0,1848
Poli 0,098%	5	0,292	± 0,1164
Poli 0,78%	5	0,172	± 0,1173

Liberação de H_2O_2

O teste de liberação de peróxido de hidrogênio foi realizado utilizando culturas celulares em presença de Zimosan (controle positivo) e somente meio RPMI-C e polietilenoglicol como controle de células na reação. Segundo os resultados obtidos e representados na tabela e Figura 6, as células estimuladas com Zimosan mostraram uma maior liberação de peróxido de hidrogênio comparada com as células estimuladas pelos cimentos, com $p < 0,001$.

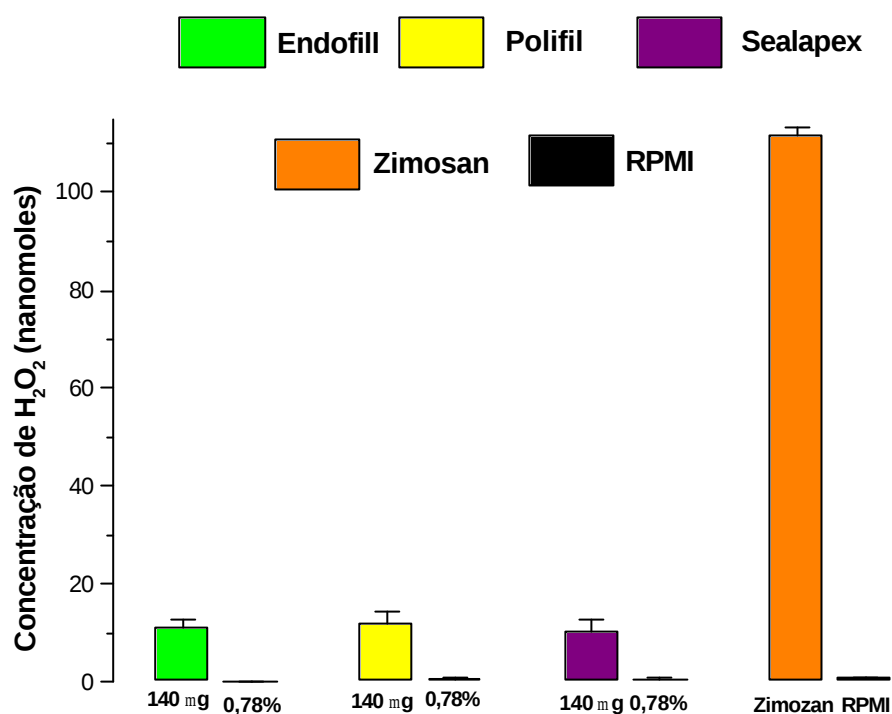


Figura 5 - Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença do Polifil, Endofill, Sealapex e Zimosan (como controle positivo) nas concentração 140 µg/mL, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78% de PEG como controle. A concentração de H₂O₂ foi determinada através de uma reta padrão previamente estabelecida ,como média ± desvio padrão.

Tabela 5 - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de diferentes concentrações dos cimentos testados

Peróxido de Hidrogênio - Cimentos			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill 140 µg	5	11.672	± 3.220
Polifil 140 µg	5	13.954	± 7.857
Sealapex 140 µg	5	10.398	± 2.362
LPS	5	111.608	± 1.66464
Poli 0,78%	5	0.154	± 0.09813
Poli 0,78%	5	0.652	± 0.2008
Poli 0,78%	5	0.526	± 0.2555

Viabilidade Celular e Concentração Celular - Constatação

Observando o teste de viabilidade celular, foi verificada a incompatibilidade de resultados quando comparados com os teste de liberação de óxido nítrico e H_2O_2 . Por esse motivo, foi realizado a determinação de NO e Peróxido de Hidrogênio em concentrações celulares variáveis, para posterior comparação com os resultados apresentados na viabilidade celular.

O ajuste celular para a realização do teste do NO é de 5×10^6 células. Nesse ajuste, pode-se observar a maior liberação do mediador.

Observando a concentração de 1×10^6 células, foi verificado uma concentração de NO estatisticamente significativa quando comparada com seu respectivo controle negativo ($p < 0,01$) e com o ajuste ideal de 5×10^6 células ($p < 0,001$).

Portanto a Figura 6, demonstra que em uma concentração 5 vezes menor, a liberação de NO atinge $62,6 \mu\text{mol}$ de nitrito, comparando com $83,4 \mu\text{mol}$ de nitrito na concentração ideal.

Na determinação da liberação do Peróxido de Hidrogênio, a concentração celular ideal para a reação é de 2×10^5 células. Observando as concentrações celulares de 2×10^6 e 5×10^5 (Figura 7), não houve diferença significativa quando comparadas com a concentração de 2×10^5 células.

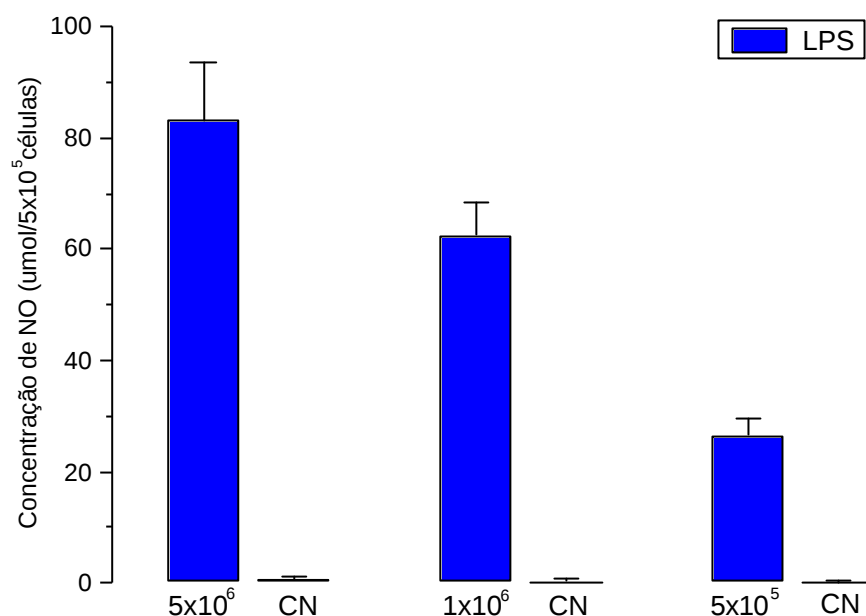


Figura 6 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em diferentes ajustes celulares em presença de LPS.

Tabela 6 - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de LPS

Concentrações de NO - LPS			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
5x10 ⁶ células	5	83.400	± 10.065
RPMI-C	5	0.6560	± 0.6282
1x10 ⁶ células	5	62.600	± 5.727
RPMI-C	5	0.4320	± 0.4202
5x10 ⁵ células	5	26.600	± 2.881
RPMI-C	5	0.2480	± 0.2590

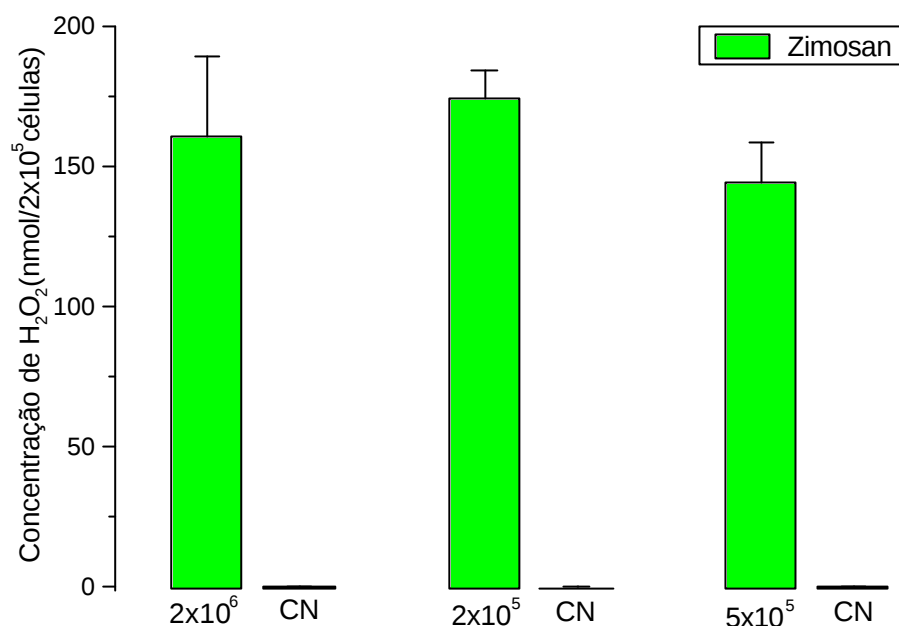


Figura 7 - Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em diferentes ajustes celulares em presença de Zimosan.

Tabela 7 - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de Zimosan

Concentrações de Peróxido de Hidrogênio - Zimosan			
TESTES	PONTOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
2x10 ⁶ células	5	160.75	± 8.756
RPMI-C	5	0.2925	± 0.2334
2x10 ⁵ células	5	174.50	± 9.434
RPMI-C	5	0.2350	± 0.1967
5x10 ⁵ células	5	144.25	± 10.569
RPMI-C	5	0.3025	± 0.2497

Discussão

Como se trata de avaliação em níveis primários de pesquisa, acreditamos ser pertinente uma discussão detalhada da metodologia.

Testes de Citotoxicidade são freqüentemente utilizados na pesquisa em Odontologia para avaliar a Citotoxicidade relativa e, assim, investigar os efeitos de materiais sobre as células. Permitem a pesquisa quantitativa para sobrevivência e proliferação celular (Baumgartner et al.¹², 1984). São importantes para a avaliação dos aspectos da segurança e eficácia dos materiais experimentados quanto à exposição aos tecidos e ao seu contato (Harrison⁵⁵, 1984; Koulauzidou et al.⁷⁸, 1999).

Trabalhos aplicados em cultivo celular de monocamadas celulares, por leitura em espectrofotômetro, têm demonstrado ser um recurso eficiente. Visam a medir a sobrevivência ou proliferação celular, demonstrando rapidez e precisão. É um método automatizado que possibilita a manipulação de um grande número de amostras com alto grau de precisão, proporcionando uma adicional vantagem: a de se trabalhar os resultados com processadores computadorizados. Estes testes medem o número de atividades de células vivas ao fim da pesquisa, sendo também de fácil reprodução (Gillies et al.⁴⁹, 1986; Margis et al.⁹⁰, 1989; Mosmann¹⁰¹, 1983).

Os testes "in vitro" são muito úteis para a compreensão dos efeitos biológicos básicos dos materiais dentários. Mas eles podem ser limitados, no que diz respeito à habilidade de simularem condições clínicas. Pode ser irreal transferir achados "in vitro" para situações clínicas. Contudo,

uma interpretação comparativa destes dados nos fornece valiosa informação do potencial geral de citotoxicidade dos materiais tratados, como relatado pelos autores Kinomoto et al.⁷⁴ (2001) e Koulaouzidou et al.⁷⁸ (1999).

Quando se avalia a relação material/hospedeiro deve-se ter bem definidos os conceitos de Biocompatibilidade e Citotoxicidade. Biocompatibilidade é a habilidade que um material tem em reagir com o organismo numa aplicação específica^{87,94,110,126,165}.

Assim um mesmo material pode comportar-se de distintas maneiras, dependendo do "sítio" onde é aplicado. Por exemplo o OZE que é componente base de um dos cimentos experimentados, quando aplicado em um preparo cavitário de dentina de média profundidade, não provoca agressão alguma ao tecido conjuntivo pulpar, podendo ser mantido nesta cavidade "ad eternum" sem nenhum problema para o organismo, portanto é biocompatível^{36,87,110,113}. Já este mesmo material quando aplicado diretamente em um tecido pulpar, promove através da liberação lenta e gradual do Eugenol uma irritação de pequena intensidade, mas que perpetua o processo inflamatório, enquanto houver o contato, sendo também biocompatível porém no surgimento de outro material onde não haja essa perpetuação do processo inflamatório, seja substituído^{34,99}.

Quando um material entra em contato com o tecido conjuntivo, rapidamente é reconhecido. As células responsáveis por este reconhecimento são os macrófagos e linfócitos^{72,75}. É o "Complexo Gênico de Histocompatibilidade", presente nestas células que reconhece tudo o que é do organismo e tudo o que é estranho a este. Alguns materiais quando inseridos no tecido conjuntivo, não são reconhecidos como estranhos, e passam

despercebidos ao "Complexo Gênico de Histocompatibilidade"^{32,62,87}. À estes materiais damos o nome de inócuos. No entanto raros são estes materiais, e ainda não se desenvolveu um cimento obturador com estas características.

De outra maneira o contato do material com macrófagos e ou linfócitos permite o reconhecimento do mesmo como "estranho". À partir daí vários fenômenos imunopatológicos podem ocorrer^{32,69,160}. Quando um cimento obturador de canais radiculares entra em contato com macrófagos é reconhecido como estranho. A partir desse reconhecimento todas as fases da fagocitose se desenvolve ou seja a porção Fc e C3b do complexo cimento-proteína aderem-se à porção Fc y R e CRI do macrófago determinando reconhecimento e acoplamento^{32,69,87}. Após estes fenômenos desencadeiam-se o englobamento da partícula pelo macrófago e à partir deste ponto a degranulação de enzimas que tentam fragmentar o "corpo estranho" (material obturador)^{32,69,161}. Dependendo do grau de "estranheza" deste material podemos ter diferentes níveis de excitação da membrana celular, que libera diferentes quantidades de NO quanto mais for estimulado^{32,69}. Dependendo também do grau de "estranheza" mais energia é necessário para que o macrófago englobe, degranule e fragmente o corpo estranho (material obturador). Quanto mais for estranho maior energia será necessária, e as mitocôndrias através da "explosão oxidativa" produzem variados níveis de ATP. Quanto mais ATP produzido, maior a quantidade de H₂O₂ liberado^{115,116}.

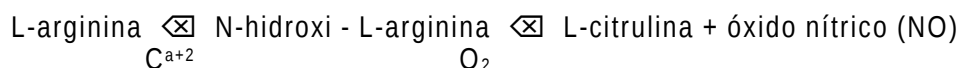
Quando se avalia citotoxicidade deve-se ter em mente que a mesma é um sub-conjunto da Biocompatibilidade^{87,110,156,159}. Quando analisamos a Biocompatibilidade sabemos como o tecido conjuntivo reage frente ao contato com um material estranho e às repercussões que este

contato produz, ou perpetuando o processo inflamatório em seus diferentes níveis ou permitindo o processo de reparo. Quando avaliamos a citotoxicidade verificamos a reação orgânica de um material em contato com um grupo específico de células^{87,110}. Cada reação orgânica pode ser interpretada independentemente e a análise da integridade dessas reações nos permite ter um conhecimento mais especificado do material avaliado^{125,169,170}.

De acordo com o que já foi citado notamos a importância do macrófago na avaliação tanto da Biocompatibilidade quanto da Citotoxicidade^{87,110,138}. Essa é a razão da nossa escolha, quanto a "célula-alvo"^{36,95,124,133}.

As duas reações por nós estudadas foram liberação de NO e H₂O₂^{87,115,116,154}.

O NO é liberado à partir da seguinte reação:



Tal liberação ocorre em função da ativação da membrana celular^{24,25,60,100,103,106}. Quanto mais tóxico (estranho) for o material obturador, maior será a liberação de NO^{100,103,106}.

O contato material/macrófagos, na estimulação da membrana celular, ocorre oxidação do substrato celular com produção de anions superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio. Tanto o O₂⁻ quanto o H₂O₂ são provenientes da "explosão oxidativa" mitocondrial^{115,116}.

O NO é um radical livre que apresenta importante papel na Patologia e Fisiologia Humana. Ele é formado a partir do aminoácido L-arginina. A conversão de L-arginina para NO é específica, considerando que

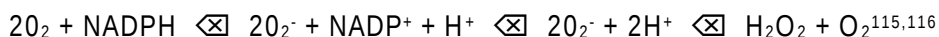
análogos da L-arginina, incluindo seu enantiômetro com configuração D não funciona como substrato^{24,100,103,106}.

O NO intermedeia as reações de relaxamento e constrição vascular^{100,103,106}. Liberado em grandes quantidades potencializa o processo inflamatório, além da ação relaxante vascular, o NO inibe a agregação plaquetária e é citoprotetor, sendo liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano, juntamente com O_2^- e H_2O_2 . Na reação inflamatória aguda a interação NO/prostaglandina é inibida com a diminuição do teor de NO, reduzindo o acúmulo de leucócitos e edema vascular^{100,103,106}.

O NO liberado à partir da ativação da membrana macrofágica atua diretamente no relaxamento dos vasos sangüíneos. Quanto mais relaxado está o vaso, maior a sua permeabilidade, permitindo à saída de mediadores químicos e células que perpetuam o processo inflamatório^{32,158}.

Já um material estranho e com variados níveis de toxicidade promovem uma "explosão oxidativa"^{115,116,126} necessária para a fagocitose. Quanto mais tóxico é o material maior a "explosão oxidativa"^{32,158,159} e subsequentemente maior a liberação de peróxido de hidrogênio.

A reação de liberação de H_2O_2 é:



O peróxido de hidrogênio além de ser um indicativo do nível de citotoxicidade atua também como agente bactericida para bactérias anaeróbias estritas.

Tanto o NO quanto o H_2O_2 se permitem corar. Ao NO aderem-se partículas do corante cromogênico que é o Reagente de Griess⁵⁰. Ao H_2O_2

adere-se o corante de Peroxidase de Raiz Forte^{115,116}. Esses dois marcadores permitem que variados níveis de marcadores colorimétricos indiquem as variadas concentrações de NO e H₂O₂ presentes em um meio, detectados por um leitor de Elisa com filtros específicos para espectros colorimétricos, que tem como parâmetro as dosagens para NO e H₂O₂^{50,100,103,106}.

Desde o nosso primeiro trabalho de avaliação de citotoxicidade de cimentos endodônticos em culturas de macrófagos, uma preocupação pertinente foi a concentração e a solubilidade dos cimentos.

Com relação a solubilidade, para eliminarmos o maior número de variáveis que pudesse interferir nos resultados, resolvemos deixar todos os cimentos com o mesmo grau de solubilidade.

Sonicando todos os cimentos separadamente e incluindo-os em solução de polietileno glicol 400 e RPMI 1640-Completo previamente testada em cultura de macrófagos, onde não se verifica liberação alguma de NO e H₂O₂. A concentração utilizada desde o primeiro trabalho de pesquisa, por nós investigando esse papel teve início em 18 mg/mL e suas respectivas frações. Até a aceitação de um primeiro trabalho nosso com essa metodologia na literatura correlata, esses foram os nossos parâmetros de concentração. A partir do ano de 2003 desenvolvido por Gutierrez⁵⁴ passam a utilizar um modelo de experimentação mais apropriado, utilizando para isso, na determinação da correta concentração, o teste M.T.T.^{101,168}. Tal teste utiliza o sal tetrazólico de M.T.T., para desenvolver um ensaio quantitativo colorimétrico da proliferação e viabilidade das células de mamíferos¹⁰¹. Está baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no M.T.T., pela ação de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias

ativa, formando cristais de formazana¹⁰¹. Assim na determinação da concentração adequada de cada cimento, cada teste avaliou a viabilidade celular das células do exsudato peritoneal de camundongos "Swiss" machos, mantidas em cultura e a produção de NO e H₂O₂ por estas células em presença de diferentes concentrações, de cada cimento testado^{111,124}. Como previamente citado a determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Mosmann¹⁰¹ (1983) baseado na propriedade que tem as células viáveis em clivar o anel tetrazólico presente no M.T.T. (brometo de 3-4-5 dimetiltiazol-2-il) - 2-5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas mitocondriais ativas¹⁰¹.

A determinação da liberação de H₂O₂, foi feita utilizando-se a técnica descrita por Pick e Keisari¹¹⁵, em 1980, nos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal. Também utilizando os sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal, determinou-se a liberação de NO, utilizando-se a técnica de Green et al.⁵⁰.

Molnar⁹⁹, 1967, leva em consideração que para os cimentos a base de OZE, outras investigações devam ser feitas, como exemplo, o processo de fabricação do óxido de zinco, tamanho de suas partículas, absorção pelo óleo, velocidade de incorporação e dispersão do Eugenol na manipulação manual, uniformidade nas formas das partículas, superfície homogênea das mesmas e também o Eugenol irritante só na quantidade de 5% livre, depois de tomado presa o cimento, a sua afinidade pelas camadas de lípidos da membrana celular das culturas de macrófagos, daí esse cimento em baixas concentrações poderia provavelmente diminuir sua citotoxicidade em relação quando em contato celular.

Torabinejad et al.¹⁵⁶, relata em que cimentos à base de OZE, contendo na sua formulação compostos à base de subcarbonato de bismuto são altamente agressivos aos tecidos células e células de defesa, o que pode ter provavelmente ocorrido também nesta metodologia onde concentrações endodônticas mais altas terem provocado aumento de citotoxicidade, em alguns resultados.

Pesquisas adicionais são necessárias para assegurar que os efeitos de tais materiais experimentados, sejam completamente compreendidos. É preciso ainda considerar que existem limitações quando as informações científicas são obtidas através do sistema de modelo de cultivo celular e os riscos de extrapolar os resultados para a clínica. Dessa forma, trabalhos visando as suas avaliações em outros níveis de pesquisa¹⁶⁴ e os seus resultados devem ser cuidadosamente extrapolados, para uma situação "in vivo"^{59,99,128,137,146,156}.

Conclusão

- **NO** - em termos de produção média de Óxido Nítrico, segundo o teste de Tuckey ao nível de 5% de significância, os cimentos analisados podem ser colocados na seguinte ordem crescente: Sealapex < Endofill = Polifil < LPS, respectivamente nas concentrações de 140µg/mL, 35µg/mL, 17µg/mL e 17µg/mL do controle positivo LPS.
- **Peróxido de Hidrogênio** - Em relação a liberação de H₂O₂ não há evidência que os cimentos analisados, nas concentrações de 140µg/mL, tenham efeitos estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de significância. Entretanto, as médias de liberação de H₂O₂ das concentrações dos respectivos cimentos analisados são cerca de cinco vezes menores que a média de liberação do controle positivo Zimosan - A.
- Portanto, dependendo da utilidade dos cimentos endodônticos e de seu modo a ser utilizado (considerando solventes, misturas, etc.) os resultados devem ser considerados significativos como primeiros estudos e os respectivos resultados aqui obtidos são necessários posteriores metodologias dependentes da finalidade para uso do material.
- Foram também utilizadas variações de concentrações celulares para o NO e para o Peróxido de Hidrogênio, onde foi constatada que as menores viabilidades podem liberar significativas quantidades de NO e H₂O₂.

Referências*

1. AL-NAZHAN, S.; SPANGBERG, L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J. Endod.*, Baltimore, v.16, n.3, p.129-134, Mar. 1990.
2. ALMEIDA, W.A. *Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães, após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical*. 1997. 192f. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
3. ANAN, H.; AKAMINE, A.; MAEDA, K. An enzyme histochemical study of the behavior of rat bone cells during experimental apical periodontitis. *J. Endod.*, Baltimore, v.19, n.2, p.83-86, Feb. 1993.
4. ARAKI, M.; SUDA, H.; SPÄNGBERG, L.S.W. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers em L929 cells and human peritoneal ligament fibroblasts. *J. Endod.*, Baltimore, v.20, n.2, p.67-70, Feb. 1994.
5. ARAKI, K.; SUDA, H.; BARBOSA, S.V.; SPÄNGBERG, L.S.W. Reduced cytotoxicity of a root sealer through eugenol substitution. *J. Endod.*, Baltimore, v.19, n.11, p.554-557, Nov. 1993.
6. ARENHOLT-BINDSLEV, D.; BLEEG, H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.23, n.2, p.84-91, Mar. 1990.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023:** informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24p.

7. ARENHOLT-BINDSLEV, D.; HORSTED-BINDSLEV, P. A simple model for evaluation relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.5, n.5, p.219-226, Oct. 1989.
8. AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. *O agronegócio da Polifil no Brasil*. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, p.92., 2001.
9. BARBOSA, S.V.; ARAKI, L.; SPÄNGBERG, L.S.W. Citotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.75, n.3, p.357-361, Mar. 1993.
10. BARTHEL, C.R.; LEVIN, L.G.; REISNER, H.M.; TROPE, M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.30, n.3, p.155-159, May 1997.
11. BAUER, P.F.; BURNS, W.A.; EINHEBER, A. The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function the immune response. *J. Exp. Med.*, New York, v.123, n.6, p.1013-1024, June 1966.
12. BAUMGARTNER, J.C.; BROWN, C.M.; MADER, C.L.; PETERS, D.D.; SHULMAN, J.D. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite and citric acid. *J. Endod.*, Baltimore, v.10, n.11, p.525-531, Nov. 1984.
13. BELTES, P.; KOULAOUZIDOU, E.; KOTOULA, V.; KORTSARIS, A.H. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.11, n.5, p.245-249, Oct. 1995.
14. BERBERT, C.C.V.; CONSOLARO, A. Influência de cimentos endodônticos na irrigação neutrofilica pelo teste "Skin Window". *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, Bauru, v.2, n.2, p.81-87, abr./jun. 1994.

15. BILGINER, S.; TIMURESENER, I.; SÖYLEMEZOGLU, F.; TIFTIK, A.M. The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.2, p.105-109, Feb. 1997.
16. BONETTI FILHO, I. *Avaliação da capacidade seladora de diferentes técnicas de obturação dos canais radiculares através da infiltração do corante Rodamina B à 0,2%*. 1986. 67f. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
17. BONETTI FILHO, I. *Avaliação da biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares. Estudo em dentes de cães*. 1990. 110f. Tese (Doutorado em Dentística Restauradora - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
18. BONINI, S.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; LARA, V.S. Resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de Polifil: estudo da migração e diferenciação de células no sítio inflamatório. *Rev. Odonto Ciência*, Porto Alegre, v.17, n.35, p.27-37, jan./mar. 2002.
19. BRATEL, J.; JONTELL, M.; DAHLGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Effects of root canal sealers on immunocompetent cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.31, n.3, p.178-188, May 1998.
20. BROWNE, R.M. Animal testes for biocompatibility od dental materials-relevance, advantages and limitations. *J. Dent.*, Guildford, v.22, suppl.2, p.521-524, Feb. 1994.
21. CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; CARVALHO, L.T.L. Implante de um floculado de resina de Polifil em alvéolo dental de rato. *Pesqui. Odontol. Bras.*, São Paulo, v.15, n.3, p.257-262, jul./set. 2001.

22. CAMARGO, W.R. *Interação dos cimentos Sealapex e CRCS com os macrófagos - estudo morfológico dos efeitos citotóxicos*. 1993. 96f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
23. CANOVA, G.C.; TAVEIRA, L.A.A.; DEZAN JR., E.; NISHIYAMA, C.K.; SPALDING, M. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, Bauru, v.10, n.3, p.128-133, jul./set. 2002.
24. CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; SANTOS, G.C.; PLACERES, M.C.P. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *J. Immunol.*, Baltimore, v.57, n.3, p.214-220, Mar. 2003.
25. CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 tumor and necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, The Hague, v.127, n.3, p.189-194, Sept. 1994.
26. CASSATELLA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today*, Amsterdam, v.16, n.1, p.21-26, Jan. 1995.
27. CAVALIERI, I.; SÁ LIMA, J.R.; GOMES, M.F. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de Polifil, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos. *BCI*, Curitiba, v.8, n.29, p.64-70, jan./mar. 2001.
28. CHIERICE, G.O. Próteses de Polifil. *Pesquisa FAPESP*, São Paulo, n.91, p.66-71, set. 2003.

29. CHONG, B.S.; OWADALLY, I.D.; PITT-FORD, T.R.; WILSON, R.F. Citotoxicity of potential retrograde root-filling materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.10, n.3, p.129-133, June 1994.
30. COSTA, C.A.S.; BENATTI NETO, C.; GONZAGA, H.F.S.; HEBLING, J. Compatibilidade biológica do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) variando a proporção pó/líquido. *Odontol. Clin.*, Araraquara, v.4, n.2, p.97-103, jul./dez. 1994.
31. COSTA, C.A.S.; MARCANTONIO, R.A.C.; HEBLING, J.; TEIXEIRA, H.M.; KURAMAE, M. Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de Polifil em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. *Odonto 2000 - Odontol. Sec. XXI*, Araraquara, v.1, n.1, p.44-48, jan./jun. 1997.
32. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflamação e reparação. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap.3, p.45-83.
33. COTTI, E.; TORABINEJAD, M. Detection of leukotriene C4 in human periradicular lesions. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.27, n.2, p.82-86, Mar. 1994.
34. CRANE, D.L.; HEUER, A.M.; KAMINSKI, J.E.; MOSER, B.J. Biological and physical properties of an experimental root canal sealer without eugenol. *J. Endod.*, Baltimore, v.6, n.2, p.438-445, Feb. 1980.
35. ECONOMIDES, N.; KOTSAKI-KOVATSI, V.P.; POULOPOULOS, A.; KOLURIS, I.; ROZOS, G.; SHORE, R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.3, p.122-127, Mar. 1995.

36. EGEA, S.J.J.; RUBIO-MANZANARES, A.J. Los macrófagos peritoneales de rata como modelo celular in vitro para el estudio de la biocompatibilidad de los materiales odontológicos. *Operatoria Dental y Endodoncia*, v.2, n.1, p.1-6, 1998.
37. ERIKSEN, H.M.; ØRSTAVIK, D.; KEREKES, J. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.4, n.3, p.114-117, June 1988.
38. ERSEV, H.; SCHMALZ, G.; BAYIRLI, G.; SCHWEIKL, H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cell *in vivo*. *J. Endod.*, Baltimore, v.25, n.5, p.359-363, May 1999.
39. FOREMAN, P.C.; BARNES, I.E. A review of calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.23, n.6, p.283-297, Nov. 1990.
40. FRASCINO, L.F. *Implante de resina poliuretana vegetal em cranioplastia: estudo experimental em coelhos*. 1998. 108f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto.
41. FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. 397p.
42. FUENTEFRIA, N.B.; BRITO, J.H.M.; WEISMANN, R. Avaliação histológica da reação tecidual, frente a implante de poliuretana vegetal, na tíbia de rato. *Rev. Odonto Ciência*, Porto Alegre, v.13, n.26, p.29-49, dez. 1998.
43. GARCÉS-ORTIZ, M.; LEDESMA-MONTES, C. Cytotoxicity of Ketac Silver cement. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.6, p.371-373, June 1997.
44. GARCIA, J.; RANGEL, I. Utilização dos implantes de polietileno-mrfpor, poliuretana de Polifil e matriz óssea bovina em defeitos ósseos maxilares: análise histológica e histométrica em macacos. *Rev. Odontol. Araçatuba*, s.n., p.85, 2000.

45. GEROSA, R.; BORIN, M.E.; CAVALLERI, G.; GAMBARINI, G. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of four eugenols. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.29, n.3, p.198, May 1996. Abstract.
46. GEROSA, R.; MENEGAZZI, G.; BORIN, M.; CAVALLERI, G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.9, p.446-448, Sept. 1995.
47. GEURTSSEN, W.; LEYHAUSEN, G. Biological aspects of root canal filling materials - histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin. Oral Investig.*, Berlin, v.1, n.1, p.5-11, Feb. 1997.
48. GEURTSSEN, W.; LEINENBACH, F.; KRAGE, T.; LEYHAUSEN, G. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.85, n.5, p.592-597, May 1998.
49. GILLIES, R.J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.*, New York, v.159, n.1, p.109-113, Nov. 1986.
50. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOCK, J.S.; TANNEBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, New York, v.126, n.1, p.131-138, Oct. 1982.
51. GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMID, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, Easton, v.54, n.10, p.1545-1547, Oct. 1965.
52. GUIGAND, M.; PELLEEN-MUSSI, P.; GOLF, A.L.; VULCAIN, J.M.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J. Endod.*, Baltimore, v.25, n.6, p.419-423, June 1999.

53. GULATI, N.; CHANDRAS, S.; AGGARWAL, P.K.; JAISWAL, J.N.; SINGH, M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.7, n.4, p.181-185, Aug. 1991.
54. GUTIÉRREZ, J.C.R. *Avaliação da citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares quanto à liberação de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos*. 2004. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
55. HARRISON, J.W. Irrigation of the root canal system. *Dent. Clin. North Am.*, Philadelphia, v.28, n.4, p.797-808, Oct. 1984.
56. HETEM, S.; KANNO, C.M.; MATHEUS, M.T.G. Testes de biocompatibilidade de materiais odontológicos seladores de canais radiculares em germes dentais *in vitro*. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v.22, n.2, p.175-185, jul./dez. 1993.
57. HOLLAND, R.; SOUZA, V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J. Endod.*, Baltimore, v.11, n.12, p.535-543, Dec. 1985.
58. HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J.A.; BERNABÉ, P.F.; NERY, M.J.; SOUZA, V.; BERBERT, A. Effect of root canal status on periodontal healing after surgical injury in dogs. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.10, n.2, p.77-82, Apr. 1994.
59. HUANG, F.M.; TAI, K.-W.; CHOU, M.-Y.; CHANG, Y.-C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.35, n.2, p.153-158, Feb. 2002.

60. IALENT, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v.211, n.2, p.177-182, Feb. 1992.
61. IGNÁCIO, H. *Utilização do cimento derivado do polímero da Polifil no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em coelhos*. 1995. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
62. JANEWAY JR., C.A.; TRAVES, P. Imunidade mediada por células T. In: JANEWAY JR., C.A.; TRAVES, P. *Imunologia: sistema imunológico na saúde e na doença*. 2.ed. Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 1997. cap.7, p.1-41.
63. JIANG, Y.; SCHILDER, H. An optimal host response to a bacterium may require the interaction of leukocytes and resident host cells. *J. Endod.*, Baltimore, v.28, n.4, p.279-282, Apr. 2002.
64. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 482p.
65. KANEKO, T.; OKIJI, T.; KAN, L.; TAKAGI, M.; SUDA, H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *J. Endod.*, Baltimore, v.28, n.5, p.337-342, May 2001.
66. KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAJKAMURA Jr., M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. J.*, London, v.9, n.2, p.443-467, June 1968.
67. KAWAKAMI, T.; NAKAMURA, C.; HASEGAWA, H.; AKAHANE, S.; EDA, S. Ultrastructural study of initial calcification in the rat subcutaneous tissues elicited by a root canal filling material. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.63, n.3, p.360-365, Mar. 1987.

68. KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorption and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.44, n.1, p.55-66, July 1999.
69. KETTERING, J.D.; TORABINEJAD, M. Presence of natural killer cells in human chronic periapical lesions. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.26, n.6, p.344-347, Nov. 1993.
70. KEUDELL, K.; POWELL, G.; DIEMER, R. Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.53, n.2, p.194-197, Feb. 1982.
71. KHARMANDAYAN, P. *Estudo da interface de contato entre osso e implantes de poliuretano com e sem carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e eletrônica de varredura em coelhos*. 1997. 175f. Dissertação (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
72. KIM, S.K.; KARABUCAK, B.; WELSCH, H.; SIMCHON, S.; KIM, S. Intracellular mechanism of substance P-induced vasodilatation in bovine dental pulps. *J. Endod.*, Baltimore, v.27, n.3, p.231, Mar. 2001. Abstract.
73. KIN, J.; LEE, J.; BAE, K. Cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.29, n.4, p.312, Apr. 2003. Abstract.
74. KINOMOTO, Y.; CARNES JR., D.L.; EBISU, S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cell *in vitro*. *J. Endod.*, Baltimore, v.27, n.9, p.574-577, Sept. 2001.
75. KO, H.J.; LIM, S.S. Tissue levels of cytokines in pulpal and periapical pathosis. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.4, p.269, Apr. 1997. Abstract 9.

76. KOLOKOURIS, I.; ECONOMIDES, N.; BELTES, B.; VLEMMAS, I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted in to the subcutaneous connective tissue of rats. *J. Endod.*, Baltimore, v.24, n.2, p.82-85, Feb. 1998.
77. KONTAKIOTIS, E.; NAKAU, M.; GEORGOPOULOU, M. *In vitro* study if the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.28, n.6, p.285-289, Nov. 1995.
78. KOULAOUZIDOU, E.A.; MARGELOS, J.; BELTES, P.; KORTSARIS, A.H. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J. Endod.*, Baltimore, v.25, n.1, Jan. p.21-23, 1999.
79. LEAL, J.M. *Estudo sobre a infiltração e o comportamento dimensional de materiais para obturação de canais radiculares, em função da variação da proporção pó-líquido e do tempo de armazenagem dos corpos-de-prova.* 1966. 62f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia e Odontologia, Araraquara.
80. LEAL, J.M.; HOLLAND, R.; ESBERARD, R.M. Sealapex, CRCS, Fill Canal e N-Rickert, estudo da biocompatibilidade em tecido conjuntivo do rato. *Odontol. Clin.*, Araraquara, v.2, n.1, p.7-14, jan./mar. 1988.
81. LEIRSKAR, J.; HELGELAND, K. Mechanism of toxicity of dental materials. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.14, n.1, p.42-48, Jan. 1981.
82. LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. Fases do tratamento do sistema de canais radiculares. In: LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* 3.ed. São Paulo: Ed. Médica Panamericana, 1998. cap.11, p.253-259.

83. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; ALMEIDA, W.A.; UTRILLA, L.S. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.15, n.1, p.28-32, Aug. 1999.
84. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, R.S. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.88, n.2, p.221-225, Aug. 1999.
85. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S.; ASSED, S.; ETHER, S.S. Calcium hydroxide root canals sealers - histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.7, p.428-432, June 1997.
86. LEONARDO, R.T. *Avaliação microscópica da reação apical e periapical frente a dois cimentos obturadores de canais radiculares à base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex) em dentes de cães*. 1992. 108f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
87. LEONARDO, R.T. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos, quanto à alteração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos*. 1997. 158f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
88. McFARLANE, C.G.; REYNOLDS, J.J.; MEIKLE, M.C. The release of interleukin-1- β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J. Periodontal. Res.*, Copenhagen, v.25, p.207-214, Nov. 1990.

89. MANGAN, D.F.; WELCH, G.R.; WAHL, S.M. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human perihelal blood monocytes. *J. Immunol.*, Baltimore, v.146, n.5, p.1541-1546, Mar. 1991.
90. MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Quantification of attached cell in tissue culture plates and on microcarriers. *Anal Biochem.*, New York, v.181, n.2, p.209-211, Sept. 1989.
91. MARKHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. *Hum. Immunol.*, New York, v.59, p.571-579, 1998.
92. MATSUMOTO, K.; INOUE, K.; MATSUMOTO, A. The effect of newly development root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J. Endod.*, Baltimore, v.15, n.2, p.60-67, Feb. 1989.
93. MERYON, S.D. An *in vitro* study if factors contributing to the blandness of zinc oxide-eugenol preparations *in vivo*. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.21, n.3, p.200-204, May 1988.
94. MERYON, S.D.; BROOK, A.M. *In vitro* comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.23, n.4, p.203-210, July 1990.
95. METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.16, n.1, p.18, Aug. 2000.
96. MILLER, G.A.; DeMAYO, T.; HUTTER, J.W. Production pf interleukin-1 polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. *J. Endod.*, Baltimore, v.22, n.7, p.346-351, July 1996.
97. MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.12, p.622-624, Dec. 1995.

98. MOLLOY, D.; GOLDMAN, M.; WHITE, R.R.; KABANI, S. Comparative tissue of a new endodontic sealer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.73, n.4, p.490-493, Apr. 1992.
99. MOLNAR, E.J. Residual eugenol from zinc oxyde-eugenol compounds. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.46, n.4, p.645-649, July/Aug. 1967.
100. MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v.43, n.2, p.109-142, June 1991.
101. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.65, p.55-63, June 1983.
102. NATHAN, C.; XIE, Q-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, Cambridge, v.78, n.6, p.915-918, Sept. 1994.
103. NORRIS, K.A.; SCHRIMPF, E.J.; FLYNN, L.J.; JR, S.M. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*, Bethesda, v.63, n.7, p.2793-2796, July 1995.
104. OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; McWILLIAM, A.A. *Consejo canadiense de protección de los animales*, 1998. Disponível em: <<http://www.ccac.ca/guides/spanish/spantofc.htm>>. Acesso em 8 jul. 2004.
105. OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGE LAND, K.O. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J. Endod.*, Baltimore, v.7, n.8, p.355-369, Aug. 1981.

106. PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived, relaxing factor. *Nature*, London, v.327, n.11, p.524-526, June 1987.
107. PARK, S.Y.; JI, G.E.; KO, Y.T.; JUNG, H.K.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.46, n.3, p.231-241, Feb. 1999.
108. PASCON, E.A. *Projeto biocompatibilidade dos materiais endodônticos: Biocompatibilidade da resina poliuretana derivada da Polifil*. 1999.165f. Dissertação (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
109. PERALA, D.G.; CHAPMAN, R.J.; GELFAND, J.A.; CALLAHAN, M.V.; ADAMS, D.F.; LIE, T. Relative production of IL-1 beta and TNF-alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J. Periodontol.*, Chicago, v.63, n.5, p.426-430, May 1992.
110. PERASSI, F.T. *Liberção de fator de necrose tumoral alta (TNF- α) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos*. 2000, 141f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
111. PERASSI, F.T.; BONETTI FILHO, I.; BERBERT, F.L.C.V.; CARLOS, I.Z.; LEONARDO, R.T. Secretion of tumor necrosis factor - alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, Sealapex and Endomethasone. *J. Endod.*, Baltimore, v.30, n.7, p.534-537, July 2004.

112. PERDIGON, G.; NADER de MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; PESCE de RUIZ HOLGADO, A. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.*, Bethesda, v.53, n.2, p.404-410, Aug. 1986.
113. PERTOT, W.-J.; CAMPS, J.; REMUSAT, M.; PROUST, J.P. "In vivo" comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.73, n.73, p.613-620, May 1992.
114. PERTOT, W.J.; STEPHAN, G.; TARDIEU, C.; PROUST, J.P. Comparison of the intraosseous biocompatibility of DYRACT and SUPER EBA. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.5, p.315-319, May 1997.
115. PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.38, n.1/2, p.161-170, June 1980.
116. PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.46, n.2, p.211-226, June 1981.
117. PISSIOTIS, E.; SPANGBERG, L.S. Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite. *J. Endod.*, Baltimore, v.16, n.10, p.468-473, Oct. 1990.
118. PISSIOTIS, E.; SPÄNGBERG, L.S.W. Toxicity of pulpispad using four different cell types. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.24, n.5, p.249-257, Sept. 1991.

119. POLLARD, J.W. Basic cell culture. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. *Methods in molecular biology: animal cell culture*. New Jersey: Humana Press, 1990. v.5, p.1-12.
120. PURICELLI, E.; BARALDI, C.E.; PONZONI, D.; PESCHKE, R. Estudo histológico do polímero poliuretano da Polifil implantado no ângulo mandibular de ratos. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre*, Porto Alegre, v.40, n.1, p.37-40, set. 1999.
121. RANSJÖ, M.; MAKLUND, M.; PERSSON, M.; LERNER, U.H. Synergistic interactions of bradykinin, thrombin, interleukin-1 and tumor necrosis factor on prostanoid biosynthesis in human periodontal-ligament cells. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.43, n.4, p.253-260, Apr. 1998.
122. RAPPAPORT, H.M.; LILLY, G.E.; KAPSIMALIS, P. Toxicity of endodontic filling material. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.18, n.6, p.785-802, Dec. 1964.
123. RASQUIN, L.C. *Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dente de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após tratamento de canais radiculares e obturação com 3 cimentos à base de hidróxido de cálcio*. 1997. 174f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
124. RASQUIN, O.M. *Citotoxicidade de cimentos endodônticos frente a macrófagos*. 2000. 127f. Tese (Livre-Docência em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Gama Filho, Rio de Janeiro.
125. ROCHA, M.J.C. *Estudo microscópico e imunocitoquímico dos cistos periodontais apicais de dentes tratados ou não endodonticamente*. 1991. 152f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.

126. ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1999. 423p.
127. ROSLINDO, N.C.; ROSLINDO, E.B.; HETEM, S.; DA MATA, A.C.; MALAGOLI, D.M. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal e germes dentários in vitro. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v.26, n.2, p.265-274, jul./dez. 1997.
128. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *J. Dent.*, Guildford, v.22, supl.2, p.6-11, Aug. 1994.
129. SCHMALZ, G.; GARHAMMER, P.; SCHWEIKI, H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endod.*, Baltimore, v.22, n.5, p.249-252, May 1996.
130. SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.64, sp.iss., p.541-548, Apr. 1985.
131. SCHWARZE, T.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J. Endod.*, Baltimore, v.28, n.11, p.749- 753, Nov. 2002.
132. SCHWARZE, T.; FIEDLER, I.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J. Endod.*, Baltimore, v.28, n.11, p.784-786, Nov. 2002.
133. SEGURA, J.J.; LLAMAS, R.; RUBIO-MANZANARES, A.J.; JIMENEZ-PLANAS, A.; GUERRERO, J.M.; CALVO, J.R. Calcium hydroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.7, p.444-447, July 1997.

134. SILVA, L.A.B. *Cimentos obturadores de canal radicular à base de hidróxido de cálcio - avaliação histopatológica do reparo apical e periapical em dentes de cães, da resposta inflamatória em tecido subcutâneo e da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos. Análise do pH, concentração de cálcio total e condutividade.* 1995. 191f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
135. SILVA, L.A.B.; LEONARDO, M.R.; FACCIOLI, L.H.; FIGUEIREDO, F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.2, p.86-90, Feb. 1997.
136. SOARES, I.J.; GOLDBERG, F.; MASSONE, E.J.; SOARES, I.M. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.16, n.4, p.166-169, Apr. 1990.
137. SPÄNGBERG, L. Biological effects of root canal fillings materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water soluble substances on human cells *in vitro*. *Odontol. Revy*, Lund, v.20, n.2, p.123-132, 1969.
138. SPÄNGBERG, L. Biologic effects of root canal filling materials 4. Effect in vitro solubilized root canal filling materials on HeLa cells. *Odontol. Revy*, Lund, v.20, n.3, p.289-299, 1969.
139. SPÄNGBERG, L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxic *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.35, n.3, p.389-401, Mar. 1973.
140. SPÄNGBERG, L.; PASCON, E.A. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. *J. Endod.*, Baltimore, v.14, n.5, p.247-250, May 1988.

141. STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.3, p.89-96, June 1990.
142. STASHENKO, P.; YU, S.M.; WANG, C.Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J. Endod.*, Baltimore, v.18, n.9, p.422-426, Sept. 1992.
143. STASHENKO, P.; WANG, C.Y.; TANI-ISHII, N.; YU, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.78, n.4, p.494-502, Oct. 1994.
144. STERN, M.H.; DREIZEN, S.; MACKLER, B.F.; LEVY, B.M. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. *J. Endod.*, Baltimore, v.7, n.9, p.447-452, Sept. 1981.
145. TAGGER, M.; TAGGER, E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH26 in monkeys. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.5, n.3, p.139-146, June 1989.
146. TAI, K.-W.; HUANG, F.-M.; CHANG, Y.-C. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J. Endod.*, Baltimore, v.27, n.9, p.571-573, Sept. 2001.
147. TAKAHARA, K.; ONODERA, A.; MATSUMOTO, K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.5, p.200-207, Oct. 1990.
148. TAKAYAMA, S.I.; MIKI, Y.; SHIMAUCHI, H.; OKADA, H. Relationship between prostaglandin E₂ concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. *J. Endod.*, Baltimore, v.22, n.12, p.677-680, Dec. 1996.

149. TANI-ISHII, N.; WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol. Immunol.*, Copenhagen, v.10, p.213-219, Oct. 1995.
150. TANI-ISHII, N.; KUCHIBA, K.; OSADA, T.; WATANABE, Y.; UMEMOTO, T. Effect of T-cell deficiency on the formation of periapical lesions in mice: histological comparison between periapical lesion formation in BALB/c and BALB/c nu/nu mice. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.4, p.195-199, Apr. 1995.
151. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.31, n.2, p.85-89, Mar. 1998.
152. TAVANO, O.; PAVAN, A.J.; SILVA, M.J.D.A.D.; GUIMARÃES, S.A.C. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de Polifil em coelhos. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, Bauru, v.7, n.3/4, p.53-58, jul./dez. 1999.
153. TEIXEIRA, H.M.; KURAMAE, M.; RAMALHO, L.T.O. Reação à resina vegetal de Polifil com carbonato de cálcio durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v.28, n.1, p.63-72, jan./jun. 1999.
154. TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.110, n.4, p.1515-1521, Dec. 1993.

155. TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; PITT FORD, R.T.; KARIYAWASAM, S.P.
Tissue reaction to implanted Super-EBA mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.11, p.569-571, Nov. 1995.
156. TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; PITT FORD, T.R.; KETTERING, J.D.
Cytotoxicity of four root end filling materials. *J. Endod.*, Baltimore, v.21, n.10, p.489-492, Oct. 1995.
157. TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; FLAX, M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.4, n.4, p.152-159, Aug. 1988.
158. TROWBRIDGE, H.O. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J. Endod.*, Baltimore, v.16, n.2, p.54-61, Feb. 1990.
159. TROWBRIDGE, H.O.; EMILING, R.C. *Inflamação: uma revisão do processo*. 4.ed. São Paulo: Quintessence, 1996. 172p.
160. UEDA, I.; MATSUSHIMA, K. Stimulation of plasminogen activator activity and matrix metalloproteinases of human dental pulp-derived cells tumor necrosis factor- α . *J. Endod.*, Baltimore, v.27, n.3, p.175-179, Mar. 2001.
161. VAJRABHAYA, L.; SITHISARN, P. Multilayer and monolayer cell cultures in cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int. Endod. J.*, Oxford, v.30, n.2, p.141-144, Mar. 1997.
162. VAJRABHAYA, L.; SITHISARN, P.; WILAIRAT, P.; LEELAPHIWAT, S.
Comparison between sulphorhidamina – B dye staining and ^{51}Cr – release method in cytotoxicity assay of endodontic sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v.23, n.6, p.355-357, June 1997.

163. VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vivo. *Infect. Immun.*, Bethesda, v.62, n.11, p.5177-5182, Nov. 1994.
164. WATTS, A.; PATERSON, R.C. Initial biological testing of root canal sealing materials: a critical review. *J. Dent.*, Guildford, v.20, n.5, p.259-265, Oct. 1992.
165. WILLIAMS, D.F. Biocompatibility: an overview. In: WILLIAMS, D.F. *Concise encyclopaedia of medical and dental materials*. Oxford: Pergamon, 1990. p.51-9.
166. YESILSOY, C.; KOREN, L.Z.; MORSE, D.R.; KOBAYASHI, C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.65, n.4, p.459-467, Apr. 1988.
167. YU, S.M.; STASHENKO, P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J. Endod.*, Baltimore, v.13, n.11, p.535-540, Nov. 1987.
168. ZHANG, W.; TORABINEJAD, M.; LI, Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J. Endod.*, Baltimore, v.20, n.10, p.654-657, Oct. 2003.
169. ZMENER, O.; CABRINI, R.L. Adhesion of human blood monocytes and lymphocytes to different endodontic cements. A methodological *in vitro* study. *J. Endod.*, Baltimore, v.12, n.4, p.150-155, Apr. 1986.
170. ZMENER, O.; CABRINI, R.L. Effects of three calcium hydroxide based materials on human blood monocytes and lymphocytes. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.3, n.1, p.28-32, Feb. 1987.

171. ZMENER, O.; GUGLIEMOTTI, M.B.; CABRINI, R.L. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.2, p.66-72, Apr. 1990.

Apêndice

As fórmulas dos cimentos, segundo o fabricante são:

SEALAPEXÒ

(Sybron Kerr Indústria e Comércio Ltda. - Guarulhos, Brasil)

BASE

Óxido de cálcio	54,0%
Benzeno butil sulfanilamida	32,0%
Óxido de zinco	14,0%
Água destilada	0,01%

CATALIZADOR

Sulfato de bário	54,0%
Resina de salicilato de metila	32,0%
Salicilato de esobitrol	14,0%
Silica pulverizada	0,01%
Dióxido de titânio	1,0%
Pigmento	1,0%

ENDOFILLÒ

(Herpo Produtos Dentários Ltda. - Petrópolis, RJ, Brasil)

PÓ

Protóxido de zinco p.a.	40,5g
Resina hidrogrenada (Staybelite)	28g
Subcarbonato de bismuto	16g
Sulfato de bário	15g
Borato de sódio anidro p.a.	0,5g

LÍQUIDO

Eugenol	5cm ³
Óleo de amendôas doces	1cm ³

POLIFILÒ

(Cimento de resina poliuretana derivada da Polifil)

(Poliquil Araraquara - Polímeros Químicos Ltda. - Araraquara, SP, Brasil)

PASTA - Seringa A

Poliol 1 mL

Óxido de zinco 2,75g

LÍQUIDO - Seringa B

Pré-Polímero 1mL (80 gotas)

Os meios de cultura utilizados foram:

MEIO RPMI 1640-COMPLETO

(Sigma-Aldrich Co., USA)

Com L-Glutamina e sem Bicarbonato de sódio

2 β - mercaptoelanol à $2 \times 10^{-5}M$

Penicilina 100 U/mL

α -glutamina 2 mM

5% de soro fetal bovino (Cutilab)

Produto nº R-6504

Armazenado à 2-8°C

SOLUÇÃO TAMPONADA DE FOSFATOS - P.B.S.

(Sigma-Aldrich Co., USA)

Sem cloreto de cálcio

Produto nº D-5773

Armazenado à 2-8°C

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO PH 7,0

9,7 mL do tampão fosfato
0,2 mL de vermelho de fenol
0,1 mL de peroxidase raiz forte
140 mO de NaCl
5,5 mO de dextrose

REAGENTE DE GRIESS

1,0g - sulfanilamida (Sigma)
0,1g - N (2 naftil) etilenodiamina (Sigma)
2,5g - ácido ortofosfórico (Merck)

Completar o volume de 100mL com água deionizada e guardar na geladeira em um frasco escuro.

SOLUÇÃO DA LÁZARUS

Violeta de Genciana (pó) 1% - 2mL
Ácido acético glacial - 3mL
H₂O destilada q.s.p. - 100mL

RPMI 1640-COMPLETO (MEIO DE CULTURA)

(FONTE NUTRICIONAL)

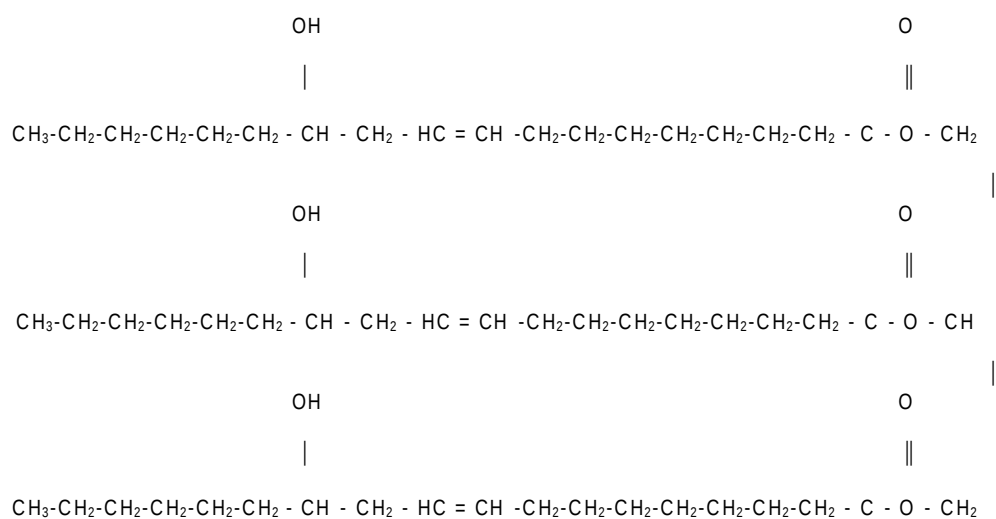
(Roswell Park Memorial Institute)

COMPONENTES	g/L
L-arginine (Free Base)	0,2
L-Asparagine (Anhydrous)	0,05
L-Aspartic Acid	0,02
L-Cystine.2HCl	0,0652
L-Glutamic Acid	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine (Free Base)	0,015
Hydroxyl-L-Proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lysine.HCl	0,04
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serine	0,03
T-Threonine	0,02
L-Tryptophan	0,005
L-Tirosine.2Na.2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02
Biotin	0,0002
Choline Chloride	0,003
Folic Acid	0,001
myo-Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
D-Panthothenic Acid Hemicalcium	0,00025
PABA	0,001
Pyridoxine.HCl	0,001
Riboflavin	0,002
Thiamine.HCl	0,001
Vitamin B ₁₂	0,000005
Calcium Nitrate.4H ₂ O	0,1
Magnesium Sulfate (Anhydrous)	0,04884
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	6,0
Sodium Phosphate Dibasic (Anhydrous)	0,8
D-Glucose	2,0
Glutathiane.Reduced	0,001
Phenol Red.Na	0,0053

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

°C	- Graus Centígrados
CO ₂	- Dióxido de Carbono
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
LPS	- Lipopolissacarídeo da <i>Scherichia coli</i>
NaOH	- Hidróxido de sódio 1M
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
ng	- nanogramas
nmoles	- nanomoles
NO	- Óxido Nítrico
PBS	- solução tampão salina-fosfato
SD	- Desvio padrão
μmoles	- micromoles
Zimosan A	- Parede celular do <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
μg/mL	- microgramas por mL
	- Tioglicolato de sódio à 3% (DIFCO)
	- RPMI 1640-Completo

FÓRMULA DO TRIGLICERÍDEO DO ÁCIDO RICINOLEICO⁸



SILVA, P.T. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos em relação aos reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos*. 2004. 171 f. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

RESUMO

Analisou-se a citotoxicidade dos seguintes cimentos: Endofill, Sealapex e Polifil, quanto à liberação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos e também utilizamos um método de análise colorimétrica usando M.T.T. Concluiu-se que as considerações presentes após os resultados, discussão e constatação os cimentos que apresentaram o menor nível de citotoxicidade foi o Endofill, seguido da equivalência de liberação de Polifil e Sealapex, embora todos foram menos citotóxicos que o Grupo Controle Zimosan-A para H₂O₂ e o LPS para o NO.

Palavras-chave: Sobrevivência celular; óxido nítrico; peróxido de hidrogênio; citotoxicidade celular anticorpo-dependente; materiais restauradores do canal radicular.

SILVA, P.T. *Citotoxicity evaluation of endodontical cements regarding the oxygen and nitrogen intermediate reactives in peritoneais macrophages media of mice*. 2004. 171 f. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ABSTRACT

It was analyzed the citotoxicity of the following cements Endofill, Sealapex, and Poliol regarding the nitric oxide (NO) release and the hydrogen peroxide (H₂O₂) in the peritoneais macrophages medium of mice in different concentrations and we have also analyzed a colorimetric method using the M.T.T. It was concluded from the considerations which were present in the results, discussion, and verification that the cement which presented the lowest citotoxicity level was the Sealapex followed by the Polifil and the Endofill, although all of them were less citotoxic than the Zimosan-A control group for H₂O₂ and the LPS for the NO.

Keywords: Cell survival; nitric oxide; hydrogen peroxide; antibody-dependent cell cytotoxicity; root canal filling materials.

