

ALESSANDRA CRISTINA GOMES

Estudo dos mecanismos envolvidos na migração celular
induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de
camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia, Campus de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia (Área de concentração:
Odontopediatria)

Orientadora: Prof Dra Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA
2006

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G633e Gomes, Alessandra Cristina
Estudo dos mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos
induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos :
MTA induz migração de neutrófilos / Alessandra Cristina Gomes. -
Araçatuba : [s.n.], 2006
137 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Cimentos dentários 2. Neutrófilos 3. Leucotrieno B4

Black D27
CDD 617.645

Dados Curriculares

ALESSANDRA CRISTINA GOMES

Nascimento	14 de setembro de 1976 Ribeirão Pires/SP
Filiação	João Eduardo Gomes Neide Gomes
1997-2000	Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade Metodista de Piracicaba - UNIMEP
2001-2002	Curso de aperfeiçoamento em Odontologia para bebês – Universidade Estadual de Londrina – UEL
2002-2004	Curso de especialização em Odontopediatria – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP
2005-2006	Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **João Eduardo e Neide**, pelo amor, dedicação e apoio para que meu sonho se realizasse.

Ao meu irmão, **João Eduardo**, pela presença constante em minha vida, pelo carinho, amizade e exemplo de vida. Você é motivo de imenso orgulho para mim!

Ao meu marido **Marcelo**, pelo incentivo, dedicação, compreensão, carinho e amor sempre demonstrados. O meu maior desafio foi abdicar de nossa convivência diária, quando cada minuto de ausência parecia uma eternidade. Amo você!

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Desde o início desta caminhada, tu estavas presente.

Momentos difíceis foram superados

Vitórias foram conquistadas.

Saudades foram sentidas.

Amizades foram criadas.

Conhecimentos foram adquiridos....

Agradeço Senhor!

À Professora Dra Sandra Helena Penha de Oliveira

Agradeço por me receber tão carinhosamente em seu laboratório, por sua orientação, pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter acreditado e confiado em mim desde o início. Ofereço minha gratidão, admiração e respeito.

Muito obrigada!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP – na pessoa dos professores Dr. Paulo Roberto Botacin, digníssimo diretor e Dr. Célio Percinoto, digníssimo vice-diretor.

Aos meus colegas de turma, Taís, Eliana T, Eliana R, Janaína e Max, pela convivência e trocas de experiências.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Odontopediatria pela convivência amiga e momentos de descontração.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof Dr. Robson Frederico Cunha, Profa Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar e Profa Dra. Rosângela dos Santos Nery.

Ao corpo docente do curso de pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelos ensinamentos transmitidos.

À técnica do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Rafaela Cristina Longhi da Cruz, pelo apoio durante a realização dos experimentos e pelos momentos de descontração que tornaram a realização deste trabalho muito mais agradável.

À Mariana Machado de Teixeira de Moraes Costa que me ensinou os primeiros experimentos no laboratório.

À amiga Nenê, pela amizade e companheirismo.

Ao laboratório do Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha chefe do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ribeirão Preto, por permitir a utilização do laboratório para realização dos ensaios ELISA.

À técnica do laboratório de inflamação da Faculdade de Ribeirão Preto, Giuliana Bertozzi, pela realização das dosagens de IL-1 β e MIP-2.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento de Ciências Básicas, pela amizade e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, Mário Luís da Silva, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira e Cleide da Silva Oliveira, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP – Araçatuba, Luzia Anderlini, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Maria Cláudia de Castro Benez, Cláudia Frare, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Jéssica Duberger Neves, Marina Alves dos Santos, Izamar da Silva Freitas, Helena Sumika Sanomiya Otsuki e Cláudio Hideo Matsumoto, pela paciência e disposição.

À Marina, Valéria e Diogo da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela atenção e paciência.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo apoio e auxílio no tratamento dos animais.

À empresa Angelus® Soluções em Odontologia, por ter cedido o material para ser utilizado nos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho (processo nº 05/53710-9).

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

GOMES, ACG. *Estudo dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos*. Araçatuba, 2006. 137p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. Observou-se que o MTA induziu migração de neutrófilos de maneira dose-dependente (0,5; 5; 50 e 100 mg/cavidade), alcançando o pico de migração 6 horas após a injeção do estímulo com a dose de 50 mg/cavidade. Esta migração foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona (1 mg/Kg), BWA4C (50 mg/Kg) e U75302 (0,5 mg/Kg). Diferentemente, a Indometacina (5 mg/Kg) foi inefetiva neste processo. Verificou-se também que os animais estimulados com MTA (50 mg/cavidade) apresentaram uma liberação significativa de IL-1 β e MIP-2 no exsudato peritoneal. O pré-tratamento com Tioglicolato aumentou em cerca de 380% a população de macrófagos na cavidade peritoneal, potencializando a migração de neutrófilos induzida pelo MTA ($p < 0,05$). O pré-tratamento com composto 48/80 depletou cerca de 75% a população de mastócitos, diminuindo a migração de neutrófilos ($p < 0,05$). A injeção de MTA na bolha de ar subcutânea induziu uma migração de neutrófilos menor comparada à cavidade peritoneal. Estes resultados confirmam a participação de mastócitos e macrófagos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA. A injeção de sobrenadante de macrófagos e mastócitos estimulados com MTA na cavidade peritoneal de camundongos causou significativa migração de neutrófilos ($p < 0,05$), que foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento

das células por dexametasona (10 μ Molar), BWA4C (100 μ Molar) e U75302 (10 μ Molar) sugerindo a liberação por essas células de LTB₄ e citocinas e/ou quimiocinas. Confirmando esses dados, macrófagos e mastócitos quando estimulados *in vitro* por MTA foram capazes de expressar RNAm para IL-1 β , MIP-2, e 5-LO. Pôde-se concluir que a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos induzida pelo MTA foi dependente de mastócitos e de macrófagos liberando IL-1 β , MIP-2 e LTB₄.

Palavras-chave: cimentos dentários, neutrófilos, LTB₄.

GOMES, ACG. Study of the mechanisms involved in cellular migration induced by MTA into peritoneal cavity in mice. Araçatuba 2006.137 p. Dissertation (Master in Pediatric Dentistry) – Dental School of Araçatuba, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the mechanism involved in the neutrophil migration induced by MTA into peritoneal cavity in mice. It was observed that MTA induced a dose dependent neutrophil migration (0.5, 5, 50 and 100 mg/cavity), achieving the peak 6 hours after the stimulation with 50 mg/cavity. Neutrophil migration was inhibited by the pre-treatment with dexamethasone (1 mg/Kg), BWA4C (50 mg/Kg) and U75302 (0,5 mg/Kg). Differently indometacin (5 mg/Kg) was ineffective in this process. It was seen that the animals stimulated with MTA (50 mg/cavity) showed a significative amount of IL-1 β and MIP-2 released to the peritoneal exudate. The pretreatment with Thioglycolate 3% increased 380% the macropahge population into the peritoneal cavity, increasing the MTA-induced neutrophil migration ($p<0.05$). The pretreatment with 48/80 compound decreased 75% the mast cell population in the peritoneal cavity and decreased the MTA-induced neutrophil migration ($p<0.05$). The injection of MTA in the air-pouch cavity induced a neutrophil migration, however, the recruitment was shorter than that induced into the peritoneal cavity. These data confirm the participation of the mast cell and macrophages in the MTA-induced neutrophil migration. The injection of MTA-stimulated macrophages and mast cells supernatants into the mice peritoneal cavity induced a significant neutrophil migration that was inhibited by the pre-treatment with dexamethasone (10 μ Molar), BWA4C (100 μ Molar) and U75302 (10 μ Molar) suggesting the release of LTB₄ and cytokines and/or chemokines by these

cells. Besides, macrophages and mast cells MTA-induced were able to express *in vitro* IL-1 β MIP-2 and 5-LO mRNA. In conclusion, the neutrophil migration into mice peritoneal cavity induced by MTA was dependent on mast cells and macrophages, which expressed IL-1 β , MIP-2 and LTB₄.

Key-words: endodontic sealer, neutrophil, LTB₄.

Lista de Figuras

FIGURA 1 A e B Dose-resposta da migração de neutrófilos mononucleares induzida pelo MTA.....	37
FIGURA 2 A e B Tempo-resposta da migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	38
FIGURA 3 Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	40
FIGURA 4 A e B Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	43
FIGURA 5 A e B Influência da depleção da população de mastócitos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	45
FIGURA 6 A e B Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para bolha de ar subcutânea e cavidade peritoneal em camundongos.....	47
FIGURA 7 A e B Efeito da atividade quimiotática do sobrenadante de mastócitos e macrófagos estimulados com MTA.....	49
FIGURA 8 A e B Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a liberação de fator quimiotático para neutrófilos por macrófagos.....	51
FIGURA 9 A e B Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a liberação de fator quimiotático para neutrófilos por mastócitos.....	53
FIGURA 10 Expressão de RNAm para IL-1 β , MIP-2 e 5-LO de	

macrófagos estimulados por MTA.....54

FIGURA 11 Expressão de RNAm para IL-1 β , MIP-2 e 5-LO de
mastócitos estimulados por MTA.....55

Lista de Tabelas

Tabela 1 Pré-medicação com diferentes drogas antiinflamatórias.....23

Tabela 2 Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos
antecipados dos produtos de amplificação.....34

Tabela 3 Determinação da produção de IL-1 β , MIP-2 no exsudato
peritoneal de camundongos estimulados por MTA.....41

Lista de Abreviaturas

Al ₂ O	Óxido de alumínio
AP-1	Proteína ativadora-1
Bi ₂ O ₃	Óxido de bismuto
BSA	Soro albumina bovino
Ca ⁺²	Íons cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CO ₂	Gás carbônico
COX	Ciclooxigenase
5-LO	5-lipoxigenase
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
fMLP	Metionil-leucil-fenilalanina
Fe ₂ O ₃	Óxido férrico
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
K ₂ O	Óxido de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄

LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LTF ₄	Leucotrieno F ₄
LXA ₄	Lipoxina
MgO	Óxido de magnésio
MIP-2	Proteína Inflamatória de macrófagos 2
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTT	Método de Mosmann
NF-κB	Fator nuclear κB
Na ₂ O ₃	Óxido de sódio
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão salina-fosfato
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina
RPMI	Meio de cultura
SCF	Fator de célula progenitora
SiO ₂	Silicato
SO ₃	Sulfito
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TNF-β	Fator de necrose tumoral β
TXA ₂	Tromboxano A ₂

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Sumário.....	xvi
1 Introdução.....	1
2 Proposição.....	19
3 Material e Métodos	
3.1 Animais.....	22
3.2 MTA.....	22
3.3 Procedimento Experimental.....	22
3.3.1 Migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	22
3.3.2 Contagem global.....	23
3.3.3 Contagem diferencial.....	23
3.3.4 Efeito do pré-tratamento com diferentes drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos.....	24
3.3.5 Determinação da produção de IL-1 β e MIP-2 no exsudato da cavidade peritoneal de camundongos estimulados por MTA.....	25
3.3.6 Avaliação do papel das células residentes na migração de neutrófilos induzida pelo MTA.....	25
3.3.6.1 Aumento da população de macrófagos com Tioglicolato 3%.....	25
3.3.6.2 Depleção da população de mastócitos com composto 48-80.....	26
3.3.6.3 Migração celular em bolha de ar subcutânea.....	26
3.3.7 Avaliação da atividade quimiotática para neutrófilos de sobrenadantes de macrófagos estimulados	

com MTA.....	26
3.3.7.1 Obtenção de macrófagos.....	26
3.3.7.2 Estimulação <i>in vitro</i> de macrófagos com MTA.....	27
3.3.8 Avaliação da atividade quimiotática para neutrófilos de sobrenadantes de mastócitos estimulados com MTA.....	28
3.3.8.1 Obtenção de mastócitos.....	28
3.3.8.2 Estimulação <i>in vitro</i> de mastócitos com MTA.....	29
3.3.9 Efeito do pré-tratamento dos macrófagos com drogas antiinflamatórias e estimulados com MTA sobre a liberação de fator quimiotático para neutrófilos.....	29
3.3.10 Efeito do pré-tratamento dos mastócitos com drogas antiinflamatórias e estimulados com MTA sobre a liberação de fator quimiotático para neutrófilos.....	30
3.3.11 Análise por RT-PCR.....	31
3.3.11.1 Extração de RNA das células.....	31
3.3.11.2 cDNA a partir da extração do RNA.....	32
3.3.11.3 Transcrição-reversa – reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).....	33
3.4 Análise Estatística.....	35

4 Resultados

4.1 Avaliação da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos induzida por diferentes concentrações de MTA.....	37
4.2 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos.....	40
4.3 Determinação da produção de IL-1 β e MIP-2 no exsudato peritoneal de camundongos estimulados por MTA.....	42
4.4 Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA em camundongos.....	43
4.5 Influência da depleção de mastócitos dos animais com composto 48/80 sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA em camundongos.....	45
4.6 Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para bolha de ar subcutânea em camundongos.....	47
4.7 Identificação da atividade quimiotática para neutrófilos liberada de mastócitos e macrófagos estimulados com MTA <i>in vitro</i>	49
4.8 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por macrófagos estimulados por MTA <i>in vitro</i>	51
4.9 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por mastócitos estimulados por MTA <i>in vitro</i>	53

4.10 Expressão de MIP-2, IL-1 β e 5-LO por macrófagos estimulados com MTA.....	55
4.11 Expressão de MIP-2, IL-1 β e 5-LO por mastócitos estimulados com MTA.....	56
5 Discussão.....	57
6 Conclusão.....	73
Referências.....	75
Anexos.....	93

Introdução

1 Introdução

Apesar dos avanços na prevenção da cárie dentária e da melhor compreensão da importância de se manter a dentição decídua hígida, ainda ocorre grande número de lesões cariosas profundas nos dentes decíduos levando ao comprometimento pulpar. Além disso, lesões traumáticas, principalmente nos dentes anteriores, apresentam prevalência elevada e podem levar a alterações pulpares (GUEDES PINTO, 2003).

A preservação dos dentes decíduos com alterações pulpares provocadas por lesões de cárie ou por trauma até a época de sua esfoliação fisiológica é de extrema importância, já que estes dentes são a base fundamental para que ocorra oclusão correta da dentição permanente evitando problemas funcionais e estéticos. Outro fator de extrema importância, característico da dentição decídua, é que o ciclo vital desses dentes é mais curto em relação aos permanentes, incluindo em seu processo de envelhecimento a reabsorção radicular fisiológica progressiva até a sua completa esfoliação (GUEDES PINTO, 2003; TOLEDO, 1996).

A restauração e manutenção dos dentes decíduos na cavidade bucal, muitas vezes devem ser precedidas por um tratamento pulpar adequado que pode ser a pulpotomia ou a pulpectomia. A indicação da terapia depende de um diagnóstico correto, além da consideração de alguns fatores como: adaptação da criança ao tratamento, importância da manutenção do elemento dental e extensão da lesão periapical verificada na radiografia (RIBEIRO *et al.*, 2001).

A pulpotomia é descrita como amputação da porção coronária da polpa dentária inflamada, seguida do tratamento do remanescente pulpar com vitalidade por meio de técnicas farmacológicas e/ou não farmacológicas que visam à

preservação da sua saúde (RIBEIRO *et al.*, 2001). Indica-se este tipo de procedimento para dentes decíduos com inflamação pulpar restrita à polpa coronária (CAMP, 1984; McDONALD; AVERY, 1991). Está contra-indicada em dentes decíduos com evidência radiográfica de reabsorção interna ou externa, evidência de doença periapical ou da região de furca, dentes sem possibilidade de restauração ou com mais de 2/3 de reabsorção radicular (CAMP, 1984; GUEDES PINTO, 2003).

Em dentes decíduos, o ideal seria utilizar medicamentos e/ou técnicas que promovessem a cura da ferida cirúrgica e permitissem a manutenção da vitalidade e a continuidade da fisiologia normal da polpa radicular remanescente até a época própria de esfoliação (RIBEIRO *et al.*, 2001).

A pulpectomia envolve a remoção de microrganismos e seus produtos e obturação para evitar a reinfecção do espaço já limpo e preparado. O canal radicular deve ser preenchido com um material que permita uma completa obturação e possua propriedades físicas e biológicas aceitáveis (HOLLAND *et al.*, 1999a). Tal procedimento é contra indicado em dentes com grande perda de estrutura radicular, reabsorção interna ou externa avançadas ou infecção periapical envolvendo a cripta do sucessor permanente (GUEDES PINTO, 2003; TOLEDO, 1996).

O material ideal para a obturação dos dentes decíduos deve apresentar um grau semelhante de reabsorção ao da raiz decídua, ser inofensivo aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente, reabsorver imediatamente quando levado além do ápice, ser anti-séptico, preencher os canais radiculares com facilidade, aderir às paredes, não contrair, ser facilmente removido quando necessário, ser radiopaco e não pigmentar o dente (GUEDES PINTO, 2003; TOLEDO, 1996).

Além disso, para que um cimento seja biocompatível, deve ser atóxico, não causar necrose tecidual e ser rapidamente aceito pelos tecidos sem manter uma seqüela inflamatória (ESTRELA *et al.*, 1994; GUEDES PINTO, 2003; TOLEDO, 1996).

Dentre os materiais que estão sendo pesquisados para o tratamento pulpar dos dentes decíduos está o agregado de trióxido mineral (MTA) (AGAMY *et al.*, 2004; EIDELMAN *et al.*, 2001; NAIK; HEGDE, 2005; HOLAN *et al.*, 2005; MAROTO *et al.*, 2006; NERY, 2000).

O MTA foi desenvolvido no início dos anos 90, pela equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia (EUA), com a finalidade de proporcionar o selamento das comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente (LEE *et al.*, 1993). Apresenta-se como um pó de finas partículas hidrofílicas composto principalmente de silicato tricálcico, aluminato de tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato, óxido de bismuto, além de outros óxidos minerais (TORABINEJAD *et al.*, 1995a). Como resultado de sua hidratação, forma-se um gel coloidal que se solidifica em menos de 3 horas, numa estrutura dura e resistente, com uma estrutura amorfa, com aparência granular (LEE *et al.*, 1993; TORABINEJAD *et al.*, 1995a).

As características deste agregado dependem do tamanho das partículas, da proporção pó/líquido utilizada, da temperatura e da presença de água (TORABINEJAD *et al.*, 1993). A natureza hidrofílica das partículas do pó do MTA faz com que este possa ser utilizado em presença de umidade. Nessa situação, a umidade presente nos tecidos, age como um ativador da reação química deste material (BERNABÉ; HOLLAND, 2003).

Uma outra característica importante que o MTA possui é a radiopacidade devida à presença de óxido de bismuto e esta é maior em relação à apresentada pelo Super EBA ou IRM, sendo ligeiramente menos radiopaco do que o Kalzinol (TORABINEJAD *et al.*, 1995a). Em função do MTA apresentar maior radiopacidade do que a guta-percha e a dentina pode ser identificado com facilidade nas radiografias (BERNABÉ; HOLLAND, 2003).

A variação do pH pode afetar o crescimento bacteriano, já que influencia a atividade enzimática desses microrganismos. O pH do MTA logo após a sua hidratação com água destilada é de 10,2. No entanto, após 3 horas esse valor sobe para 12,5 e se estabiliza (TORABINEJAD *et al.*, 1995a). Em um estudo avaliando o índice do pH e a liberação de íons cálcio do ProRoot MTA e MTA-Angelus, foi possível observar que os cimentos testados apresentaram pH alcalino e a maior liberação de íons cálcio ocorreu no período de 3 horas (DUARTE *et al.*, 2003).

A habilidade seladora exibida pelo MTA provavelmente deve-se à sua natureza hidrofílica e suave expansão quando é manipulado em ambiente úmido (TORABINEJAD *et al.*, 1995a) prevenindo a microinfiltração bacteriana (ADAMO *et al.*, 1999; BATES *et al.*, 1996; ESTRELA *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 1998; SCHEERER *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2002) e a infiltração de endotoxinas (TANG *et al.*, 1997).

O uso de materiais na cavidade bucal é antigo. Apesar de alguns materiais terem sido desenvolvidos há muito tempo e estarem ainda em uso clínico, o avanço das pesquisas nas últimas décadas tem direcionado a uma preocupação cada vez maior não só com as propriedades mecânicas, mas também com a biocompatibilidade destes materiais dentários (COSTA; SOUZA, 2005).

Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem contudo causar danos ou prejuízo ao mesmo. Hoje, o estudo da biocompatibilidade envolve não só os aspectos físicos e biológicos dos materiais, mas também os aspectos do tecido que está sendo substituído e tecidos adjacentes. Assim, antes de se inserir um material para substituir um tecido perdido, deve-se conhecer a estrutura e função deste tecido assim como as propriedades do material (STANLEY, 1995).

Atualmente, uma vasta gama de metodologias pode ser empregada nos testes de biocompatibilidade de materiais. Desta maneira, Organizações governamentais ou não, como a Federation Dentaire Internationale (FDI), International Standards Organization (ISO), American Dental Association (ADA) têm procurado regulamentar e padronizar tais metodologias (AMERICAN DENTAL ASSOCIATION, 1982; INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION, 1994; STANLEY, 1985).

Muitos estudos têm avaliado a biocompatibilidade do MTA em tecido subcutâneo de ratos (HOLLAND *et al.*, 1999b, 2001a, 2002; MORETTON *et al.*, 2000; MOTTA *et al.*, 2003; TORABINEJAD *et al.*, 1995b; YALTIRIK *et al.*, 2004), tecido pulpar (AEINEHCHI *et al.*, 2003; FARACO JÚNIOR; HOLLAND, 2001; FORD *et al.*, 1996; HOLLAND *et al.*, 2001b; MENEZES *et al.*, 2004; TZIAFAS *et al.*, 2002), tecidos periapicais (APAYDIN *et al.*, 2004; ECONOMIDES *et al.*, 2003; BERNABÉ *et al.*, 2005; NERY, 2000; TORABINEJAD *et al.*, 1995a, 1997), alvéolo dentário (DeGROOD *et al.*, 1995; OKAMOTO, 1964) e culturas de células (ABDULLAH *et al.*, 2002; BALTO *et al.*, 2004; BONSON *et al.*, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2003, 2005; KEISER *et al.*, 2000; KOH *et al.*, 1997,1998; MITCHELL *et al.*,

1999; NAKAYAMA *et al.*, 2005; OSÓRIO *et al.*, 1998; PELLICIONI *et al.*, 2004; PISTORIUS *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2000).

Quando aplicado sobre o tecido pulpar o MTA induziu menos inflamação e formação de ponte de dentina com maior espessura e continuidade quando comparado a outros materiais à base de hidróxido de cálcio (ABEDI *et al.*, 1996; PITT FORD *et al.*, 1996). Andelin *et al.* (2002) observou que a ponte de dentina formada apresentava características de dentina normal ou dentina terciária. A presença de tecido necrótico próximo à ponte de tecido duro induzida pelo MTA sugere que o material, similarmente ao hidróxido de cálcio, inicialmente cause necrose de coagulação em contato com o tecido conjuntivo da polpa (HOLLAND *et al.*, 1999b). Esta reação deve ter ocorrido devido aos produtos de alta alcalinidade, desde que o pH inicial durante a manipulação é de 10,2 e após três horas é de 12,5 (TORABINEJAD *et al.*, 1995a).

A resposta biológica dos tecidos periapicais de dentes de cães após apicectomia e obturação com MTA ou amálgama foi avaliada. Num período de 2 a 5 semanas ou 10 a 18 semanas foi observado que todas as raízes preenchidas com amálgama apresentavam inflamação de moderada para severa e apenas um terço das raízes com MTA apresentava inflamação moderada. O infiltrado inflamatório encontrado adjacente ao amálgama era predominantemente de leucócitos enquanto adjacente ao MTA era de linfócitos. Não foram encontrados tecido capsular fibroso e formação de cimento sobre o amálgama, enquanto no MTA havia tecido capsular fibroso e formação de cimento em todas as amostras no período de 10 a 18 semanas (TORABINEJAD *et al.*, 1995c). A deposição de tecido mineralizado junto à superfície apicectomizada e material retrobturador também foi encontrada em outros

trabalhos, além da ausência de processo inflamatório (BERNABÉ *et al.*, 2005; TORABINEJAD *et al.*, 1997).

O MTA quando utilizado como material obturador apresentou fechamento total do ápice em dentes permanentes e decíduos e ausência de reação inflamatória apicalmente (HOLLAND *et al.*, 1999a, TORABINEJAD *et al.*, 1995c, 1997; NERY, 2000).

A resposta do MTA também foi avaliada quando utilizado em subcutâneo de ratos havendo concordância entre os diferentes autores, evidenciando que no período de sete dias ocorre necrose de coagulação e calcificação distrófica com infiltração celular inflamatória moderada, macrófagos primários e células gigantes. Aos 14 dias, foi observada uma reação moderada com menor extensão do infiltrado inflamatório, com a presença de células mononucleares e um aumento de fibras colágenas. Aos 30 dias observou-se reação leve, diminuição da área reacional, presença de poucas células mononucleares e aumento de fibroblastos e fibras colágenas, formando uma cápsula basicamente fibrosa. (HOLLAND *et al.*, 1999b; MORETTON *et al.*, 2000; MOTTA *et al.*, 2003, YALTIRIK *et al.*, 2004). Aos 60 dias foi observado um infiltrado moderado de macrófagos, fibroblastos, células gigantes e presença de cápsula fibrosa (MORETTON *et al.*, 2000; YALTIRIK, 2004). Aos 90 dias não houve infiltrado inflamatório (YALTIRIK, 2004).

O MTA quando utilizado em implantes subcutâneos de ratos levou à formação de granulações birrefringentes à luz polarizada perto da abertura dos tubos de dentina contendo MTA. As granulações são estruturas semelhantes aos cristais de calcita observados com o hidróxido de cálcio. Apesar do MTA não conter hidróxido de cálcio em sua composição, contém óxido de cálcio que, em contato com água, seria convertido em hidróxido de cálcio que, em contato com os fluidos teciduais, se

dissociaria em íons Ca^{2+} e OH^- . Os íons cálcio, reagindo com o CO_2 dos tecidos daria origem às granulações de calcita, gerando acúmulo de fibronectina, que por sua vez propiciaria a migração, adesão e diferenciação celular com conseqüente formação de tecido duro, similar ao observado com a implantação de hidróxido de cálcio (HOLLAND *et al.*, 1999b).

Visto que o MTA gera acúmulo de fibronectina propiciando a adesão celular, também pode levar à ocorrência de proliferação, diferenciação e produção de uma matriz extracelular sobre um substrato (MASHIMA; MIZUGUCHI, 1992; RE *et al.*, 1994). Os osteoblastos que aderiram ao MTA foram considerados numerosos quando comparados ao controle (KOH *et al.*, 1997). Estes resultados de adesão e crescimento celular foram comparáveis a estudos similares que utilizaram células osteoblásticas (KOH *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2000), células de osteossarcoma (HUANG *et al.*, 2005; PELLICCIONI *et al.*, 2004) e fibroblastos (BONSON *et al.*, 2004; OSÓRIO *et al.*, 1998).

A toxicidade do MTA tem sido testada sobre osteoblastos, fibroblastos e células de osteossarcoma através do método de Mosmann (MTT) para avaliar a capacidade da enzima mitocondrial (metabolismo celular) e o ensaio de cristal de violeta para avaliar a proliferação celular. O MTA mostrou não ser tóxico em culturas de L-929, já que mostrou uma tendência em aumentar a atividade enzimática mitocondrial, enquanto Super EBA e amálgama foram tóxicos, pois inibiram a atividade enzimática (OSÓRIO *et al.*, 1998). A alta viabilidade celular na presença de MTA coincide com estudos que utilizaram fibroblastos (KEISER *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1999; PISTORIUS *et al.*, 2003; SAIDON *et al.*, 2003), osteoblastos (MITCHELL *et al.*, 1999), osteoblastos like (PELLICCIONI *et al.*, 2004) e células de osteossarcoma (HUANG *et al.*, 2005).

A exposição celular a diferentes materiais odontológicos pode levar a efeitos imunotóxicos químicos (TRIZIO *et al.*, 1988; WOOD *et al.*, 1992). O dano celular ocorre como resultado à exposição química aos tecidos biológicos. Tal prejuízo leva a um aumento na migração celular para o local agredido e acredita-se que o controle molecular para estas reações seja as citocinas. A avaliação das citocinas sob condições experimentais fornece quantificação dos níveis de biocompatibilidade dos materiais utilizados (HUANG *et al.*, 2005).

Desta forma, o uso de citocinas e a quantificação dos seus níveis para avaliar a citotoxicidade do MTA também foi avaliada em diversos estudos. Culturas de células de osteossarcoma humano estimuladas com MTA mostraram níveis mais altos de IL-4 e IL-10 do que as estimuladas com LIFE e Super EBA, já níveis semelhantes de IL-2 foram encontrados nas culturas estimuladas com todos os materiais (HUANG *et al.*, 2005). Na presença de MTA, estas mesmas células foram capazes de expressar IL-6 e IL-8 (MITCHELL *et al.*, 1999). Culturas de osteoblastos estimuladas com MTA mostraram níveis elevados de IL-1 α , IL-1 β e IL-6. Em contraste, células estimuladas com IRM produziram níveis de citocinas indetectáveis, visto que o IRM causa morte celular e conseqüente diminuição na liberação de citocinas (KOH *et al.*, 1998). Na presença de MTA, estas células também foram capazes de liberar colágeno (PELLICCIONI *et al.*, 2004), IL-1 beta, IL-6 e IL-18 (ABDULLAH *et al.*, 2002).

Visto que o MTA é um material biocompatível, suas indicações clínicas são: capeamento pulpar (AEINEHCHI *et al.*, 2003; ABEDI *et al.*, 1996; ANDELIN *et al.*, 2002; FARACO Jr; HOLLAND, 2001; MENEZES *et al.*, 2004; PITT FORD *et al.*, 1996; SOARES, 1996; TORABINEJAD *et al.*, 1999; TZIAFAS *et al.*, 2002), pulpotomia (HOLLAND *et al.*, 2001b; TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999), apicificação

(SHABAHANG *et al.*, 1999; TITTLE *et al.*, 1996) e material obturador de canais (HOLLAND *et al.*, 1999a; TORABINEJAD *et al.*, 1997). Pode ser indicado também como tampão cervical em clareamentos dentários internos, material restaurador temporário (CUMMINGS; TORABINEJAD, 1995), reparo de fraturas radiculares verticais (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; SCHWARTZ, 1999) e tampão apical (KWAK, 2000). Além disso, pode ser utilizado em perfurações radiculares e de furca (HOLLAND *et al.*, 2001c; LEE *et al.*, 1993; WELDON *et al.*, 2002), material retrobturador em cirurgias parendodônticas (BERNABÉ *et al.*, 1999; TORABINEJAD *et al.*, 1993, 1997) e material selador de perfurações resultantes de reabsorções internas e externas comunicantes (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 1999). No tratamento de dentes decíduos também pode ser empregado como material obturador (NERY, 2000; O'SULLIVAN; HARTWELL, 2001) e em pulpotomias (AGAMY *et al.*, 2004; EIDELMAN *et al.*, 2001; MAROTO *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos em várias pesquisas favorecem o uso do MTA na Odontologia já que este possui capacidade de selamento e de regeneração do tecido periradicular, induz osteogênese e cementogênese e possui efeito mineralizador. Desta forma, o MTA têm uma influência significativa sobre os tecidos do sistema orofacial induzindo o processo de reparo. O reparo inicia-se durante as primeiras fases da inflamação, mas atinge seu clímax geralmente após ter sido neutralizada a influência agressora (ROBBINS, 1991). Assim sendo, a inflamação está intimamente relacionada com o processo de reparo (TAKAHASHI, 1998).

A inflamação se caracteriza pela reação do tecido vivo vascularizado a uma agressão local, quer seja de natureza física, química ou biológica. Este mecanismo de defesa inclui uma série de reações bioquímicas que acontecem, basicamente na microcirculação, tecido conjuntivo e no sangue. Quando um tecido é traumatizado ou

torna-se localmente infectado, é desencadeada uma reação inflamatória (ALLEN et al., 1998). A resposta inflamatória compreende 3 componentes principais (1) aumento do fluxo sanguíneo, (2) aumento da permeabilidade capilar e (3) aumento da migração celular. Sendo assim, a inflamação se caracteriza por um ordenado recrutamento celular, no qual diferentes tipos celulares são solicitados em diferentes focos inflamatórios, dependendo da natureza do estímulo.

A inflamação aguda tem uma duração relativamente curta, podendo persistir desde minutos até poucos dias. Este processo é caracterizado pelo predomínio de fenômenos exsudativos, permitindo o acúmulo de líquido, fibrina, leucócitos e hemácias na região inflamada. Já a inflamação crônica possui uma duração mais longa podendo persistir semanas ou meses. Neste processo, além dos fenômenos exsudativos, ocorrem no local os fenômenos produtivos, envolvendo a proliferação de vasos, fibroblastos, migração e proliferação de monócitos e linfócitos (MONTENEGRO; FRANCO, 1999; COLLINS, 2000).

Durante o processo inflamatório, uma variedade de fatores solúveis está envolvida no recrutamento de leucócitos, através do aumento da expressão de moléculas de adesão celular e de fatores quimiotáticos. Muitos destes fatores regulam a ativação das células residentes (tais como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e também das células inflamatórias recém recrutadas (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) (COLLINS, 2000).

Os leucócitos primeiro rolam, isto é decorrente da fraca adesão entre as selectinas e seus receptores leucocitários; tornam-se ativados por mediadores que atuam sobre as selectinas endoteliais; aderem-se ao endotélio pela ativação e aumento da afixação das integrinas de leucócitos e então ocorre a emigração leucocitária mediada pela interação entre as moléculas de adesão e os respectivos

receptores (COLLINS, 2000; SPRINGER, 1994). Após a emigração, os leucócitos dirigem-se para o local da injúria devido à orientação ordenada a favor de um gradiente quimiotático. Diferentes agentes exógenos e endógenos exercem quimiotaxia para os leucócitos tais como: produtos de microrganismos, mediadores plasmáticos e produtos das próprias células da inflamação (leucotrienos e algumas citocinas e/ou quimiocinas, como a IL-8). Portanto, estes agentes, ou mediadores inflamatórios são capazes de induzir a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos, ativando-os de forma a facilitar a interação entre moléculas específicas de adesão presentes na superfície dos leucócitos e da parede endotelial (SPRINGER, 1994; LIPOWSKY, 1996).

Os mediadores podem atuar em um ou alguns tipos celulares, ter alvos difusos, ou até mesmo efeito diferentes de acordo com os tipos de células e tecidos. Muitas variáveis podem modificar esse processo básico, incluindo a natureza e a intensidade da lesão, o material indutor da lesão, o local, o tecido afetado e a resposta do hospedeiro (COLLINS, 2000).

Dentre os mediadores químicos mais importantes, estão as aminas vaso-ativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (sistema complemento, sistema de cininas e sistema de coagulação), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), fatores ativadores plaquetários, citocinas, quimiocinas, além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (COLLINS, 2000; MULLER, 2002; CINAMON *et al.*, 2001).

Os metabólitos do ácido araquidônico, ou eicosanóides, são responsáveis pelo controle de muitos processos fisiológicos, estando entre os mais importantes mediadores e moduladores da resposta inflamatória (SERHAN *et al.*, 1996). Este ácido não ocorre livremente nas células, mas normalmente é esterificado em

fosfolipídios de membrana e em menor escala nos glicerídeos das membranas celulares. Quando as células são ativadas por estímulos de diferentes naturezas, os lipídeos de suas membranas são remodelados para gerar mediadores biologicamente ativos, atuando como sinais intra ou extracelulares. A etapa inicial desse processo é a liberação do araquidonato, sendo a enzima responsável por esse processo a fosfolipase A_2 que é encontrada intracelularmente ou nos líquidos extracelulares, sendo a primeira forma apontada como responsável pela geração de mediadores inflamatórios. O ácido araquidônico livre é metabolizado por duas classes principais de enzimas, as ciclooxigenases, que resultam na formação de prostaglandinas e tromboxanos, e as lipoxigenases, originando os leucotrienos e as lipoxinas (COLLINS, 2000).

A ciclooxigenase é classificada atualmente em três formas sendo a COX-1, COX-2 e COX-3 (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A COX-1 é encontrada em diversas células como enzima constitucional a qual participa de uma série de eventos fisiológicos, particularmente no estômago, intestino, plaquetas e rins. A COX-2, divide-se em COX-2a, constitutiva, e COX-2b, induzida, as quais apresentam um importante papel nesse processo e no mecanismo da dor (HAWKEY, 1999). A ciclooxigenase é encontrada ligada ao retículo endoplasmático, tendo uma ação inicial que oxigena o araquidonato, seguida de ciclização produzindo o endoperoxídeo cíclico, o PGG_2 , e uma ação da peroxidase que converte PGG_2 em outro endoperoxídeo cíclico o PGH_2 (LANDS, 1981). A COX-3 pode ser encontrada de forma considerável no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002) e diferentemente da COX-1 e COX-2, não resulta na produção de prostanóides pró-inflamatórios e sim de produtos

antiinflamatórios desta família, sendo encontrada na fase tardia do processo inflamatório (WILLOUGHBY *et al.*, 2000).

As etapas subseqüentes diferem de acordo com os tipos celulares, levando ao início da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (prostanóides), sendo os principais produtos da via da ciclooxigenase a PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , TXA_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A outra via do metabolismo do ácido araquidônico ocorre através da ação das três enzimas lipoxigenases, presentes apenas em alguns tipos celulares, resultando na formação dos leucotrienos e das lipoxinas. São enzimas solúveis localizadas no citosol, sendo encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima desse grupo é a 5-lipoxigenase (5-LO), predominante nos neutrófilos, sendo a primeira enzima da biossíntese dos leucotrienos. Na ativação celular, esta enzima é translocada para a membrana celular, onde se associa à proteína ativadora da 5-LO, necessária à síntese de leucotrienos. A etapa seguinte é a síntese do leucotrieno A_4 (LTA_4) que pode ser convertido enzimaticamente em LTB_4 e é o precursor do LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 e LTF_4 , que são os cistenil leucotrienos. O LTB_4 é um potente ativador das respostas funcionais de neutrófilos, atuando na aderência de leucócitos ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (COLLINS, 2000).

As lipoxinas, também metabolizadas pelas enzimas lipoxigenases, possuem diversas atuações pró-inflamatórias e antiinflamatórias. Inibem a quimiotaxia e aderência dos neutrófilos, porém estimulam a aderência de monócitos (MADOX, 1998). A LXA_4 estimula a vasodilatação e atenua a vasoconstrição induzida pelo LTC_4 . Existe, portanto, uma quantidade inversa de lipoxinas e leucotrienos, sugerindo que as lipoxinas podem ser reguladores negativos da ação dos leucotrienos (BRADY, 1995).

O processo inflamatório também pode ser modulado por citocinas e quimiocinas que são proteínas sintetizadas por diversos tipos celulares. As citocinas são produzidas durante respostas imunes e inflamatórias, sendo sua liberação transitória e estreitamente regulada. Podem atuar influenciando a síntese ou ação de outras citocinas, ligando-se a receptores específicos nas células alvo. Podem atuar também sobre as mesmas células que as produziram, sobre células próximas ou sistematicamente, como qualquer outro hormônio. As citocinas são agrupadas em classes, de acordo com suas funções ou com a natureza das células-alvo. Existem citocinas que regulam a ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos. Entre elas, estão a IL-2 e IL-4. Outro grupo envolve as citocinas que atuam na imunidade natural, estimulando diretamente o aumento da aderência de leucócitos a células endoteliais, ao qual pertencem o TNF- α , a IL-1, os interferons do tipo I e a IL-6. Existem também as citocinas que ativam células inflamatórias, ativando macrófagos durante as respostas imunes celulares e incluem IL-5, IL-10, IL-12, TNF- α e TNF- β . Além disso, existe o grupo das citocinas que estimulam a hematopoiese, atuando no crescimento e diferenciação dos leucócitos imaturos, ao qual pertencem a IL-3 e IL-7 (MONTENEGRO; FRANCO, 1999; COLLINS, 2000).

A IL-1 é uma citocina fundamental na resposta do organismo à invasão de microrganismos, reações imunológicas e injúria tecidual, sendo produzidas principalmente por macrófagos, mas também por monócitos e células endoteliais. Como atividades biológicas de uma forma geral pode-se citar que é quimiotática para monócitos e neutrófilos, aumenta a proliferação de fibroblastos, induz a produção de collagenases e prostaglandinas e aumenta consideravelmente a reabsorção óssea por osteoclastos (LARSEN; HENSON, 1983; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; STASHENKO, 1990).

Existem duas formas de IL-1, a IL-1 α e a IL-1 β , com atividades biológicas bastante semelhantes, localizadas em genes distintos. Existe ainda um terceiro membro da família de genes da IL-1, o IL-1Ra (antagonista específico do receptor da IL-1), que age inibindo as ações pró-inflamatórias da IL-1 (DINARELLO, 1997). A IL-1 α permanece associada a células e é ativa principalmente durante o contato célula a célula, enquanto a IL-1 β é a forma predominante nos líquidos biológicos (TATAKIS, 1993). Além disso, IL-1 β estimula a infiltração de neutrófilos e pode agir como mediador final através de indução e secreção de eicosanóides e quimiocinas (BAGGIOLINI, 1998; ZHANG *et al.*, 2001).

A IL-1 β é uma das citocinas que está presente nos sítios inflamatórios endodônticos, cerca de 60% da atividade de reabsorção óssea são atribuídos a ela, independente de distúrbios endodônticos sintomáticos ou não (STASHENKO, 1990; WANG *et al.*, 1997).

As quimiocinas são um grupo específico de citocinas que compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiotaxise) e o movimento dirigido (quimiotaxia), sendo particularmente importantes na inflamação. Atualmente, as quimiocinas são classificadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteína localizados na porção amino terminal da molécula. As quimiocinas atuam em células-alvo por meio de receptores específicos ligados a proteínas G, caracterizados por apresentarem 7 domínios transmembrânicos. Após a ligação com o receptor, a sinalização é realizada pela proteína G, que por meio de suas subunidades desencadeia eventos bioquímicos que resultam nos efeitos que as quimiocinas exercem sobre as células (MURDOCH; FINN, 2000). São classificadas em quatro classes principais, CC, CXC, CX₃C e C.

As quimiocinas C-X-C ou α atuam principalmente nos neutrófilos, sendo a IL-8 e MIP-2 exemplos desse grupo. MIP-2 está relacionada com quimiotaxia e migração de neutrófilos (McCOLL; CLARK-LEWIS, 1999). São secretadas por macrófagos ativados, células endoteliais e outros tipos celulares, promovendo a ativação e quimiotaxia de neutrófilos (BICKEL, 1993). Outro grupo de quimiocinas é classificado como C-C ou β , as quais geralmente atuam na quimiotaxia de monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, mas normalmente, não sobre neutrófilos. Um terceiro grupo, as quimiocinas C ou γ , são relativamente específicas para linfócitos (TEIXEIRA *et al.*, 1997). As quimiocinas CX₃C, mais recentemente descritas, também promovem a aderência de leucócitos ao endotélio e atuam como agente quimiotático (BAZAN, 1997).

Portanto, para que se conheça o processo de reparo induzido pelo MTA é necessário entender o processo inflamatório de uma forma mais abrangente, já que o reparo inicia-se nas primeiras fases da inflamação. A resposta inflamatória do MTA frente aos diferentes tecidos tem sido avaliada, contudo não existem dados de literatura que relatam os eventos envolvidos no processo inflamatório, eventos esses responsáveis pela migração celular para o local da lesão quando o MTA é utilizado. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos envolvidos no recrutamento celular induzido pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos.

Proposição

2 Proposição

O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos induzida pelo MTA. Para isso avaliamos:

- O padrão da migração celular que foi recrutado para o foco inflamatório após o desafio com o MTA;
- O efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos para identificação dos mediadores envolvidos no processo;
- A identificação das células residentes responsáveis pela liberação do fator quimiotático para neutrófilos, e
- A produção de mediadores (IL-1 β e MIP-2) e enzima 5-LO por macrófagos e mastócitos estimulados com MTA *in vitro*.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

Previamente à realização deste estudo, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araçatuba, para apreciação, o qual foi aprovado (Protocolo 32/05). (Anexo A)

3.1 Animais

Nos experimentos propostos foram utilizados em média grupos de cinco a seis camundongos Balb-c com peso de 18-20g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista (Campus de Araçatuba). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água, antes de serem submetidos aos ensaios.

3.2 MTA

O MTA da marca comercial Angelus® Soluções em Odontologia (Ângelus, Londrina, PR, Brasil), constituído de SiO_2 , K_2O , Al_2O_3 , Na_2O , Fe_2O_3 , SO_3 , CaO , Bi_2O_3 , MgO e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio) foi utilizado em todos os experimentos .

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Migração de neutrófilos induzida pelo MTA

A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos foi induzida por uma suspensão de MTA diluídas em 0,5 mL de água destilada, nas concentrações de 0,5; 5,0; 50 e 100 mg/cavidade (cav). O grupo controle recebeu uma injeção de tampão fosfato (PBS). Os animais foram sacrificados por

deslocamento cervical 6, 12, 24 e 48 horas após a administração do estímulo e as cavidades peritoneais foram lavadas com 4 mL de PBS contendo heparina (10 UI/mL), para contagem global e diferencial das células.

3.3.2 Contagem global

Para a realização da contagem global, foram utilizadas alíquotas de 20 μ L do lavado peritoneal, diluído em 380 μ L de líquido de Turk (proporção de 1:20). A contagem global foi efetuada utilizando a Câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico em aumento de 40x e contador manual, observando-se a presença de células inflamatórias, sem, entretanto, diferenciá-las. A partir dos resultados obtidos nessa contagem, foi calculado o número total de células em cada cavidade.

3.3.3 Contagem diferencial

Para a realização da contagem diferencial, o restante do lavado obtido de cada animal foi centrifugado a 100 X g durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas com 200 μ L de BSA 0,3%. As lâminas foram preparadas com a adaptação de um papel filtro à superfície. Então, as células ressuspensas foram colocadas na lâmina preparada. As lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente por 24 horas, sendo coradas pelo método Diff Quick. As células foram examinadas em microscópio óptico através de óleo de imersão com lente objetiva (aumento de 100x). Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares (macrófagos e linfócitos) e, em experimentos específicos, também

mastócitos. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de leucócitos.

3.3.4 Efeito do pré-tratamento com drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA

Para a identificação dos possíveis mediadores químicos envolvidos nesse processo inflamatório, os animais foram pré-tratados com as seguintes drogas:

Tabela 1 – Pré-medicação com diferentes drogas antiinflamatórias

DROGA	FABRICANTE	AÇÃO	DOSE	VIA
Dexametasona	Sigma Chem	Glicocorticóide	0,5 mg/Kg	S.C
Indometacina	Sigma Chem	Inibidor da ciclooxigenase	5 mg/Kg	S.C
BWA4C	Welcome Res	Inibidor da 5-lipoxigenase	50 mg/Kg	S.C
U75302	Cayman Chem	Antagonista de receptor de LTB ₄	0,5 mg/Kg	S.C

A concentração das drogas antiinflamatórias usadas *in vivo* foi descrita na literatura (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992; HENRIQUES *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1994). O veículo utilizado para a administração das drogas foi o PBS, sendo a Indometacina diluída em TRIS e o BWA4C diluído em DMSO e PBS (OLIVEIRA *et al.*, 1994, CANETTI *et al.*, 2001). Todas as drogas foram administradas 30 minutos antes da injeção do estímulo, exceto a dexametasona que foi injetada 1 hora antes (SILVA *et al.*, 2004). A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após a injeção do estímulo, como descrito anteriormente.

3.3.5 Determinação da produção de IL1- β e MIP-2 no exsudato da cavidade peritoneal de camundongos estimulados por MTA

A produção de IL1- β e MIP-2 foi avaliada a partir do exsudato inflamatório peritoneal coletado 6 horas após a administração do estímulo MTA (50 mg/cav). Para tanto utilizamos o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpos anti-IL1- β ou anti-MIP-2, diluídos em tampão fosfato de cálcio, durante 15-18 horas a 4°C. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e bloqueadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo 1% de BSA. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células ou com IL1- β ou MIP-2 recombinantes durante 1 hora a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo.

3.3.6 Avaliação do papel das células residentes na migração de neutrófilos induzida pelo MTA

3.3.6.1 Aumento da população de macrófagos com Tioglicolato 3%

As cavidades foram pré-estimuladas intraperitonealmente com 1 mL de tioglicolato 3% (Difco), três dias antes da injeção do estímulo, para aumentar a população de macrófagos (RIBEIRO *et al.*, 1997). Foi realizada então a injeção dos estímulos, o MTA (50 mg/cav), e o fMLP (Sigma) (100 nmol/cav) (SILVA *et al.*, 2005). Após 6 horas da aplicação dos estímulos, os animais foram sacrificados, sendo realizados os mesmos procedimentos para contagem global e diferencial.

3.3.6.2 Depleção da população de mastócitos com composto 48/80

As cavidades peritoneais dos camundongos foram depletadas de mastócitos pelo tratamento com composto 48/80 (Sigma), uma droga que induz desgranulação dessas células (DI ROSA *et al.*, 1971). O composto 48/80 foi administrado intraperitonealmente no 1º, 2º e 3º dia, em duas doses diárias de 0,6 mg/Kg e no 4º dia em duas doses de 1,2 mg/Kg (intervalo de 12 horas entre as doses) (OLIVEIRA, *et al.*, 2002). No 5º dia foi realizada então a injeção dos estímulos, sendo o MTA (50 mg/cav), e o fMLP (100 nmol/cav). Após 6 horas da aplicação do estímulo, os animais foram sacrificados, sendo realizados os mesmos procedimentos para contagem global e diferencial.

3.3.6.3 Migração celular em bolha de ar subcutâneo

Para fazer a bolha de ar nos animais, seguiu-se o procedimento descrito por Edwards *et al.* (1981). O dorso dos animais foi tricotomizado, sendo injetados 5 mL de ar estéril. A manutenção das bolhas foi realizada 3 dias após, injetando-se 4 mL de ar estéril. Os animais foram utilizados experimentalmente no 6º dia, recebendo uma injeção de MTA na dose de 50 mg/cav na cavidade formada. O sacrifício dos animais ocorreu 6 horas após a injeção do MTA, sendo a bolha de ar lavada com PBS para coleta do exsudato.

3.3.7 Avaliação da atividade quimiotática para neutrófilos de sobrenadantes de macrófagos de camundongos estimulados com MTA

3.3.7.1 Obtenção de macrófagos

Todos os procedimentos relatados a seguir foram realizados em ambiente estéril na câmara de fluxo laminar (VECO).

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos. No 1º dia foi injetado intraperitonealmente 1,0 mL de tioglicolato 3% para aumentar a população de macrófagos. No 4º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, realizou-se a antissepsia do abdômen com álcool iodado a 0,3% e o peritônio de cada animal foi exposto com auxílio de tesoura e pinça. Em seguida, foram injetados em cada cavidade peritoneal 2 mL de RPMI 1640 (Sigma) estéril. Após massagem manual, o líquido intraperitoneal foi aspirado com auxílio de seringas e agulhas.

Os lavados peritoneais foram distribuídos em placas de 24 poços (Corning), sendo colocados 2 mL/poço. As placas foram incubadas a 37°C, durante 1 hora em incubadora com 5% de CO₂. Essa etapa permitiu a aderência dos macrófagos às placas.

Ao final da incubação, os sobrenadantes com células não aderentes foram desprezados e as células aderidas lavadas 3 vezes com soro fisiológico. Esse procedimento elimina as demais células presentes no lavado, visto que elas normalmente não aderem. Então, foram colocados 2 mL de RPMI completo em cada poço e os macrófagos foram incubados.

3.3.7.2 Estimulação *in vitro* de macrófagos com MTA

Os macrófagos aderentes (10⁶/ poço) de camundongos foram estimulados com 0,5 mL de suspensão de MTA (50 mg/mL) a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂. A suspensão de MTA foi adicionada a um “insert”, para evitar o contato direto com as células. Após este período, os sobrenadantes foram desprezados, os macrófagos foram lavados com RPMI incompleto e incubados em 0,5 mL de RPMI completo para a liberação do fator quimiotático para neutrófilos a

37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂. Ao final da incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e esterilizados em filtro Millipore 0.22 µm (Corning). Logo a seguir, 0,5 mL do material recolhido foi injetado na cavidade peritoneal de cada camundongo normal. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após, como descrito anteriormente.

3.3.8 Avaliação da atividade quimiotática para neutrófilos de sobrenadantes de mastócitos de camundongos estimulados com MTA

3.3.8.1 Obtenção de mastócitos

Os mastócitos foram obtidos a partir da medula óssea de camundongos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, realizada a antissepsia dos animais com álcool iodado a 0,3% e o corte dos fêmures dos animais foi realizado com ajuda de tesoura e pinça. Após remoção de músculo e pele, as extremidades dos fêmures foram cortadas e a medula óssea de cada animal foi lavada com 1mL de DMEM completo (Sigma), sendo o lavado armazenado em placa de Petri. Em cada placa foram lavados três fêmures. Após esta etapa, foram acrescentados 7 mL de DMEM completo com 15% de soro fetal bovino, 200 ng de SCF (Peprotech) e 100 ng de IL-3 (Peprotech) por placa. As placas permaneceram em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ por 1 semana. Após este período, os sobrenadantes foram retirados, centrifugados a 100 X g durante 5 minutos, descartados e as células ressuspendidas em 20 mL de DMEM completo, 200 ng de SCF e 100 ng de IL-3. Neste momento, as células foram colocadas em garrafa para cultura de células de 75 cm³(Corning). As células permaneceram em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ durante quatro semanas, sendo que a concentração do SCF foi aumentada em 100

ng/ por garrafa semanalmente, dependendo da proliferação celular e a de IL-3 foi de 100 ng durante todas as semanas.

3.3.8.2 Estimulação *in vitro* de mastócitos com MTA

Mastócitos (3×10^6 / poço) em 0,25 mL de DMEM completo foram estimulados com 0,25 mL de suspensão de MTA (50 mg/mL) a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂. A suspensão de MTA foi adicionada em um “insert”, para evitar o contato direto entre a suspensão e as células. Então, após este período os sobrenadantes foram recolhidos em tubos de microcentrífuga estéreis, centrifugados a 100 X g durante 5 minutos e descartados. O “pellet” de mastócitos foi ressuspensionado com 500 µL DMEM completo, e incubados a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂ para a liberação do fator quimiotático para neutrófilos. Ao final da incubação os sobrenadantes foram recolhidos em tubos de microcentrífuga estéreis, centrifugados a 100 X g durante 5 minutos e os sobrenadantes esterilizados em filtro Millipore 0,22 µm (Corning). Desta forma, 0,5mL do sobrenadante foi injetado em cada cavidade peritoneal de camundongos normais. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após, como descrito anteriormente.

3.3.9 Efeito do pré-tratamento dos macrófagos com drogas antiinflamatórias e estimulados com MTA sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos

Macrófagos foram pré-tratados com drogas antiinflamatórias: dexametasona (10 µMolar) (RAMOS *et al.*, 2003), BWA4C (100 µMolar) (OLIVEIRA *et al.*, 1994) e U75302 (10 µMolar) (GAUDREAULT *et al.*, 2005) a 37°C, durante 30 minutos em incubadora com 5% de CO₂, antes da estimulação das células com MTA. Após esta

etapa, as células foram estimuladas com 0,5 mL de suspensão de MTA (50 mg/mL), na presença das drogas, a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂. A suspensão de MTA foi adicionada em um “insert” para evitar o contato direto entre as células e a suspensão de MTA. A seguir os sobrenadantes foram descartados, os macrófagos lavados com RPMI incompleto e incubados com 0,5 mL de RPMI completo a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂ para liberação do fator quimiotático também na presença das drogas descritas acima. Ao final da incubação para liberação do fator, os sobrenadantes foram esterilizados em filtro Millipore 0,22 µm e 0,5 mL do material foi injetado na cavidade peritoneal de cada camundongo normal. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após.

3.3.10 Efeito do pré-tratamento dos mastócitos com drogas antiinflamatórias e estimulados com MTA sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos

Mastócitos (3X 10⁶/ poço) em 0,25 mL de DMEM completo foram pré-tratados com drogas antiinflamatórias: dexametasona (10 µMolar), BWA4C (100 µMolar) e U75302 (10 µMolar) a 37°C, durante 30 minutos em incubadora com 5% de CO₂, antes da estimulação das células com MTA. Após esta etapa, os mastócitos foram estimulados com 0,25 mL de suspensão de MTA (50 mg/mL), na presença das drogas a 37°C, durante 1 hora e meia em incubadora com 5% de CO₂. A suspensão de MTA foi adicionada em um “insert” para evitar o contato direto entre as células e a suspensão. A seguir os sobrenadantes foram retirados, centrifugados a 100 g X durante 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Os mastócitos foram incubados com 0,5 mL de DMEM a 37°C, durante 1h e meia em incubadora com 5% de CO₂ para liberação do fator quimiotático também na presença das drogas descritas

acima. Ao final da incubação para liberação do fator, os sobrenadantes foram esterilizados em filtro Millipore 0,22 μm e 0,5 mL do material foi injetado na cavidade peritoneal de cada camundongo normal. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após, como descrito anteriormente.

3.3.11 Análise por RT-PCR

3.3.11.1 Extração de RNA das células

Para extração do RNA total contido nas amostras celulares de macrófagos e mastócitos estimulados com MTA, em cada poço da placa de 24 poços contendo as células foi adicionado 1 mL de Trizol (Life Technologies) para promover lise celular. As amostras foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1500 μL e congeladas a -70°C , até o momento da extração de RNA.

Para a extração do RNA, os tubos de microcentrífuga contendo as amostras de macrófagos e mastócitos foram descongelados. Para cada uma das amostras foram adicionados 200 μL de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa e centrifugação a $15.700 \times g$ durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C , para separação das fases.

Após a centrifugação, obtiveram-se três fases no ependorf: fase transparente, correspondendo ao RNA total; fase branca, correspondendo ao DNA genômico e fase rosa, correspondendo ao Trizol. Coletaram-se 500 μL da fase transparente, os quais foram transferidos para um novo ependorf estéril. Em seguida, foi adicionado 500 μL de álcool isopropílico, realizando-se novamente agitação vigorosa, seguida pelo armazenamento a -20°C , por pelo menos 4 horas para precipitação do RNA.

Após este período as amostras foram centrifugadas a $15.700 \times g$ durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C . Os tubos de microcentrífuga foram

mantidos em gelo e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi acrescentado 500 µL de álcool 75%, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se os tubos de microcentrífuga a 9.300 X g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi, novamente descartado, os tubos de microcentrífuga foram deixados abertos e invertidos sobre um papel filtro em temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora para permitir a secagem das amostras. Para dissolver o RNA total, os tubos de microcentrífuga receberam 20 µL de água livre de DNase e Rnase. Então, as amostras de RNA foram armazenadas a -70°C até o uso.

3.3.11.2 cDNA a partir da extração do RNA

A extração de cDNA foi realizada a partir do RNA total. Os tubos contendo amostras de RNA foram descongelados, homogeneizados e armazenados em gelo. A seguir, 2 µg de RNA foram diluídos em volume de 8 µL em cada amostra, os quais foram transferidos para um novo ependorf. Em seguida, foi adicionado 1 µL de Oligod T (Invitrogen) (0,5 µg/µL). Os tubos de microcentrífuga foram incubados a 70°C por 10 minutos e a 4°C por 5 min em termociclador. Após este período, foi preparada uma solução para ser adicionada às amostras, sendo que para cada amostra foi necessário: 4 µL de dNTP (Invitrogen) (2,5 µM), 4 µL de tampão 5 x para PCR (Invitrogen) (250 mM TRIS-HCl), 2 µL dTT (Invitrogen) (0,1M) e 1 µL de RT (Invitrogen) (200 U/µL). Em cada amostra foram adicionados 11 µL da solução, a seguir os tubos de microcentrífuga foram centrifugados a 4°C por 30 segundos e foram colocados em termociclador a 42°C por 1 hora e 90°C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.3.11.3 Transcrição reversa- reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)

RT-PCR combina síntese de cDNA vindo de RNA molde com PCR para fornecer um método rápido e sensível para verificar a expressão gênica. RT-PCR é usado para quantificar a expressão de RNAm, vindos de uma concentração pequena de RNA (SANTOS *et al.*, 2004). Este método foi utilizado para verificar a expressão de IL-1 β , MIP-2 e 5-LO de macrófagos e mastócitos *in vitro*.

Os tubos de microcentrífuga foram numerados, mantidos em gelo e em cada ependorf foi colocado 1 μ L de cDNA mais 4 μ L de água livre de DNase e RNase.

A seguir foi preparada uma solução, sendo que para cada amostra foram necessários: 11,4 μ L de água livre de DNase e RNase, 2,5 μ L de 10 X tampão para PCR (Invitrogen) (200 mM TRIS-HCl), 2 μ L de dNTP (Invitrogen) (2,5 μ M), 1,5 μ L de MgCl₂ (Invitrogen) (50 mM), 1 μ L de primer (100 μ M), 0,1 μ L de TAq DNA polimerase (Invitrogen) (5 U/ μ L). Então foi adicionado a cada ependorf 20 μ L da solução, resultando em um volume total de 25 μ L. Os tubos de microcentrífuga foram centrifugados a 4°C por 30 segundos e foram colocados em termociclador de acordo com a temperatura de amplificação, anelamento e extensão para cada primer.

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão constitutiva β -actina de macrófagos e mastócitos, constituiu de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 56°C e extensão 45 segundos a 72°C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final).

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão induzida de IL-1 β de mastócitos, constituiu de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida por 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 1 minuto a

94⁰C, anelamento por 1 minuto a 55⁰C e extensão 1 minuto a 72⁰C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72⁰C (extensão final). Para o alvo IL-1 β de macrófagos alterou-se somente o número de ciclos para 25.

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão induzida MIP-2 de mastócitos, constituiu de desnaturação inicial por 4 minutos a 94⁰C seguida por 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 45 segundos a 94⁰C, anelamento por 45 segundos a 55⁰C e extensão 45 segundos a 72⁰C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72⁰C (extensão final). Para o alvo MIP-2 de macrófagos alterou-se somente o número de ciclos para 30.

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão induzida 5-LO de mastócitos, constituiu de desnaturação inicial por 4 minutos a 94⁰C seguida por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 1 minuto a 94⁰C, anelamento por 1 minuto a 59⁰C e extensão 2 minutos a 72⁰C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72⁰C (extensão final). Para o alvo 5-LO de macrófagos alterou-se somente o número de ciclos para 35.

O tamanho dos pares de base e a sequência de primers utilizados para β -actina, IL-1 β , MIP-2 e 5-LO estão de acordo com a literatura (GARLET *et al.*, 2005; PASCUTTI *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2000; CHU *et al.*, 1990), respectivamente e estão na tabela 2.

Tabela 2- *Primers* utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação

Alvo	Tamanho Antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
β -actina	349 pb	tggaatcctgtggcatccatga	taaaacgcagctcagtaacagt
IL-1 β	204 pb	ttgacgaccccaaaagatg	agaaggtgctcatgtcctca
MIP-2	355 pb	tgctgaagaccatgccaagg	gtagccttgcccttgg
5-LO	332 pb	tccacatcctcaagcagcac	gtagccaaacatgaggtctcc

Para detecção dos produtos amplificados de tamanhos antecipados, uma alíquota de 13 μ L de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose (196 mL de água livre de DNase e RNase, 3,6 g de agarose, 4 mL de tampão TAE 50 X) corado com 10 μ L de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) (Invitrogen). A eletroforese foi feita a 90V, por 150 min, em uma cuba de eletroforese horizontal, e o cDNA visualizado sob luz ultra-violeta em um transiluminador. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de tamanhos conhecidos (DNA *ladder*, Invitrogen 100-1500 pb). A fotodocumentação dos géis de agarose foi realizada com a utilização de máquina Polaróide.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Prism 3.0. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste de correção de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

4 Resultados

1 Avaliação da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos induzida por diferentes concentrações de MTA

A migração de neutrófilos induzida pelo MTA injetado em cavidade peritoneal de camundongos ocorreu de maneira dose-dependente (figura 1A). Observamos que as doses de 5, 50 e 100 mg/mL induziram migração de neutrófilos estatisticamente significante, quando comparadas ao grupo controle, no tempo de 6 horas. Neste tempo, pode-se notar um pequeno recrutamento de mononucleares que não foi estatisticamente significante, quando comparado ao grupo controle.

O pico de recrutamento de neutrófilos induzido pelo MTA (50 mg/mL) para cavidade peritoneal ocorreu 6 horas após a injeção do estímulo, quando comparado ao grupo controle (PBS), diminuindo 48 horas após (figura 2A). Desta forma, a dose de MTA utilizada nos demais experimentos foi de 50 mg/mL, sendo a migração de neutrófilos avaliada 6 horas após a injeção do estímulo. Apesar de não observamos recrutamento de células mononucleares 6 horas após, verificamos que 48 horas após a injeção do estímulo ocorreu o pico de migração de células mononucleares (figura 2B).

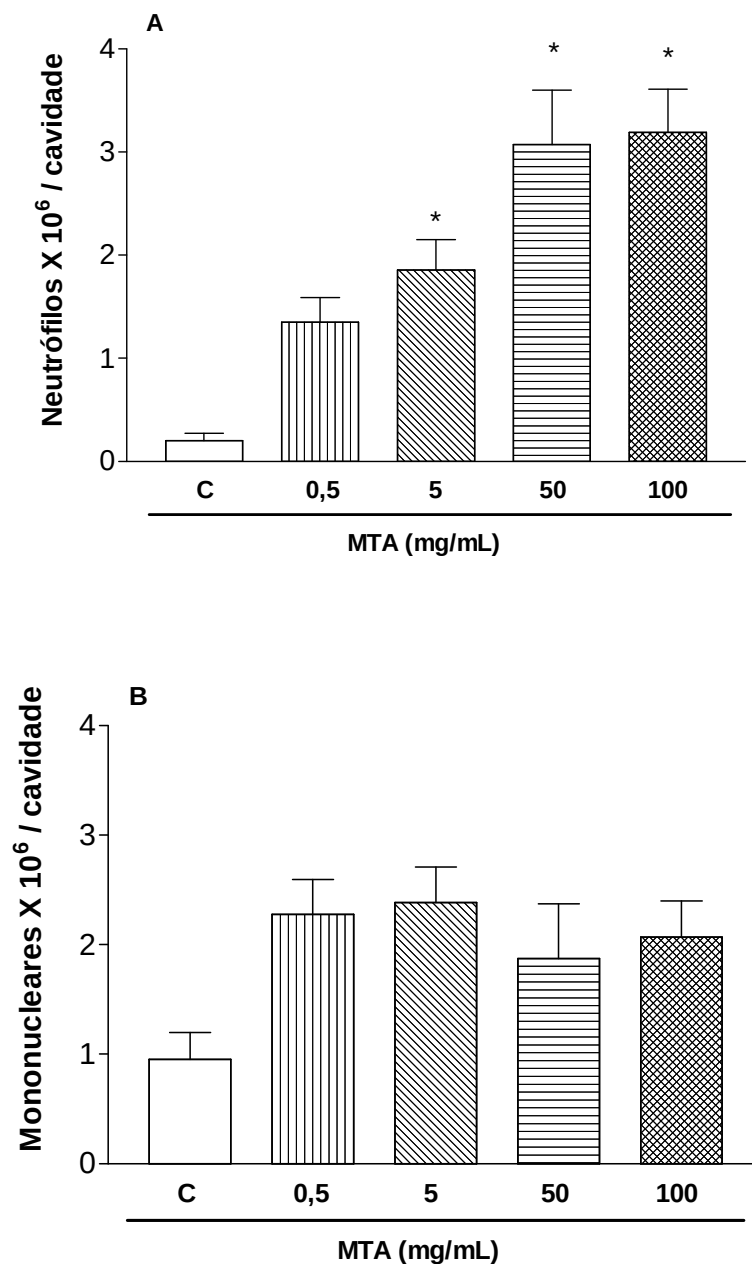


FIGURA 1: Dose-resposta da migração de neutrófilos e mononucleares induzida pelo MTA. (Painel A) - A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongo foi induzida pelo MTA nas concentrações de 0,5; 5; 50 e 100 mg/mL. (Painel B) - A migração de mononucleares para cavidade peritoneal de camundongo foi induzida pelo MTA nas concentrações de 0,5; 5; 50 e 100 mg/mL. O recrutamento foi avaliado 6 horas após a administração do estímulo. (C) - grupo controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

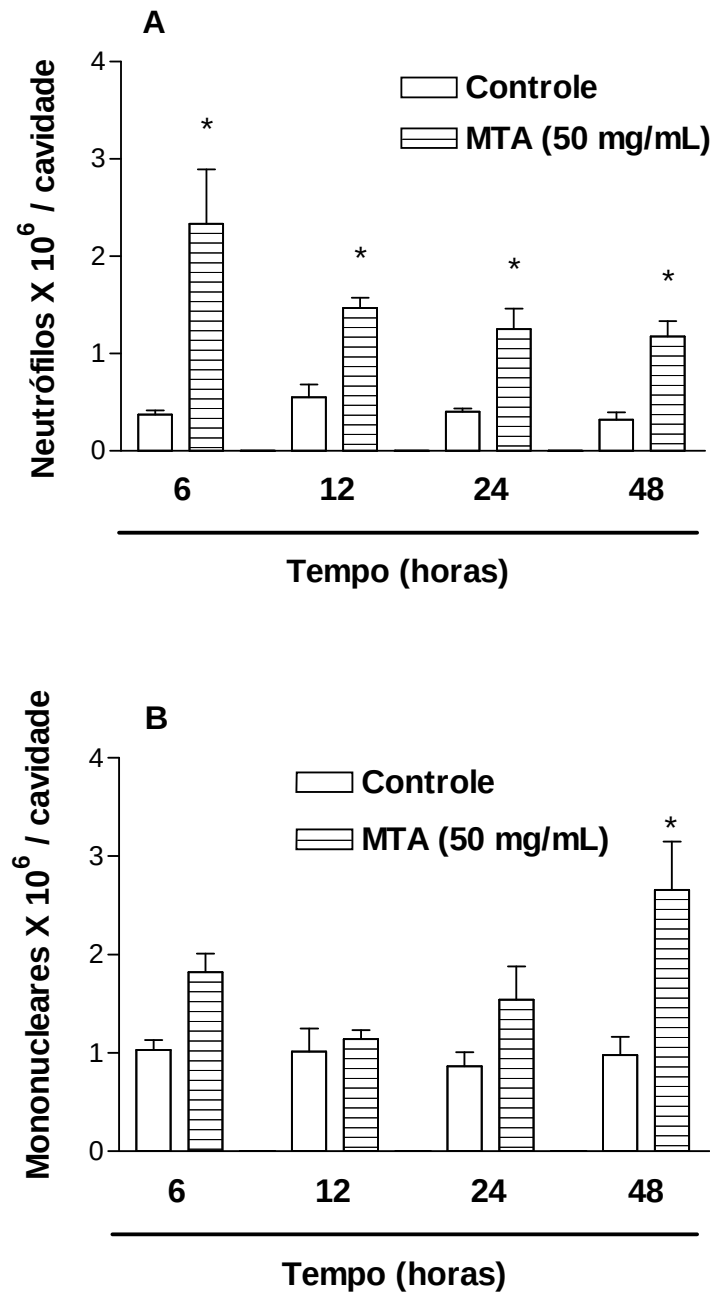


FIGURA 2: Tempo-resposta da migração de neutrófilos e mononucleares induzida pelo MTA. (Painel A) - A migração de neutrófilos, induzida pelo MTA (50 mg/mL), para cavidade peritoneal de camundongo foi avaliada, 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção do estímulo. (Painel B) - A migração de mononucleares, induzida pelo MTA (50 mg/mL), para cavidade peritoneal de camundongo foi avaliada 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção do estímulo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

2 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos

Com a finalidade de investigar os mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com drogas antiinflamatórias, tais como: glicocorticóide (Dexametasona, 1mg/Kg), inibidor de ciclooxigenase (Indometacina, 5mg/Kg), inibidor da 5-lipoxigenase (BWA4C, 50mg/Kg) e antagonista de receptor leucotrieno B₄– BLT1 (U75302, 0,5mg/Kg). As drogas Dexametasona, BWA4C e U75302 foram efetivas em inibir o recrutamento de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos de maneira estatisticamente significativa. Entretanto, a Indometacina não foi efetiva em inibir essa migração (figura 3).

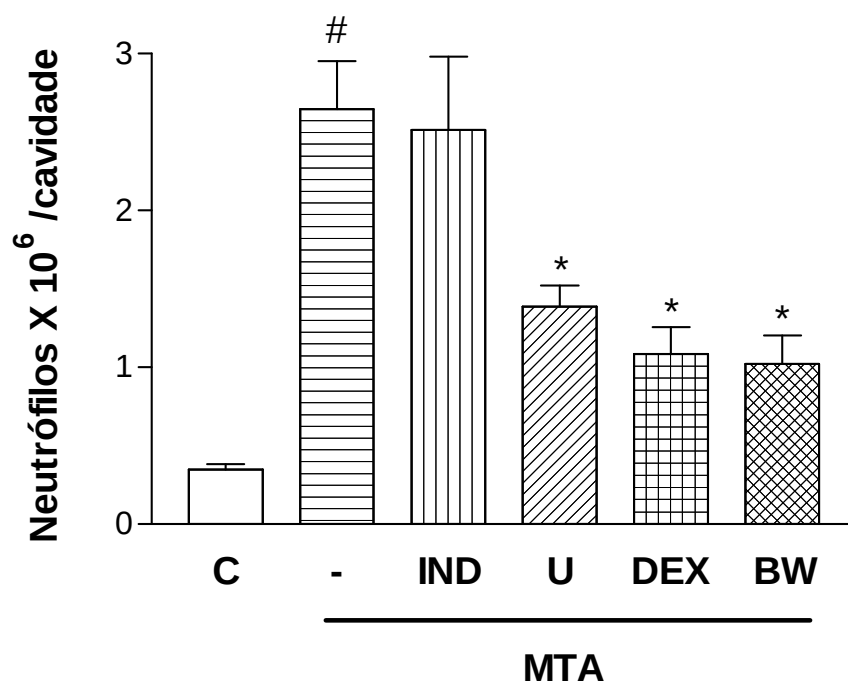


FIGURA 3: Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA. A migração de neutrófilos, induzida pelo MTA (50 mg/mL) para cavidade peritoneal de camundongo foi avaliada após o pré-tratamento com indometacina (IND), inibidor da ciclooxigenase (5 mg/Kg); U75302 (U), antagonista de receptor de LTB₄ (0,5 mg/Kg); dexametasona (DEX), glicocorticóide (1mg/Kg) e BWA4C (BW), inibidor da 5-lipoxigenase (50 mg/Kg), 6 horas após a injeção do estímulo. Os resultados foram expressos pela média ± EPM. # p<0,05 em relação ao controle e * p<0,05 em relação ao MTA (ANOVA com correção de Bonferroni).

3 Determinação da produção de IL-1 β e MIP-2 no exsudato peritoneal de camundongos estimulados por MTA

No sentido de avaliar a presença de citocinas e quimiocinas no processo inflamatório induzido pelo MTA, a produção de IL-1 β e MIP-2 foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). A produção de IL-1 β e MIP-2 nos grupos estimulados com MTA mostrou-se aumentada em cerca de 8 vezes em relação ao controle (tabela 3).

Tabela 3- Níveis de IL-1 β e MIP-2 no exsudato peritoneal de camundongos

Grupo Experimental	MIP-2 pg/mL	IL-1 β pg/mL
PBS (controle)	1,2 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,9
MTA	19,6 $\pm$ 0,2*	186,1 $\pm$ 12,3*

A produção de IL-1 β e MIP-2 foi quantificada 6 horas após a injeção do estímulo. Os resultados representam a média $\pm$ EPM. das amostras em triplicata representativa de 1 ensaio experimental. * p<0,05 (ANOVA com correção de Bonferroni).

4 Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA em camundongos

Com a finalidade de avaliar a participação das células residentes no processo, foi utilizado o pré-tratamento dos camundongos com tioglicolato a 3%. O tioglicolato é um meio de cultura irritante para cavidade peritoneal, o qual aumentou cerca de 380% a população de macrófagos para cavidade peritoneal após 72 horas (figura 4 A). O aumento da população de macrófagos devido ao pré-tratamento com tioglicolato 3% também aumentou a migração de neutrófilos induzida pelo MTA. No entanto, não alterou a migração de neutrófilos induzida pelo fMLP (figura 4B).

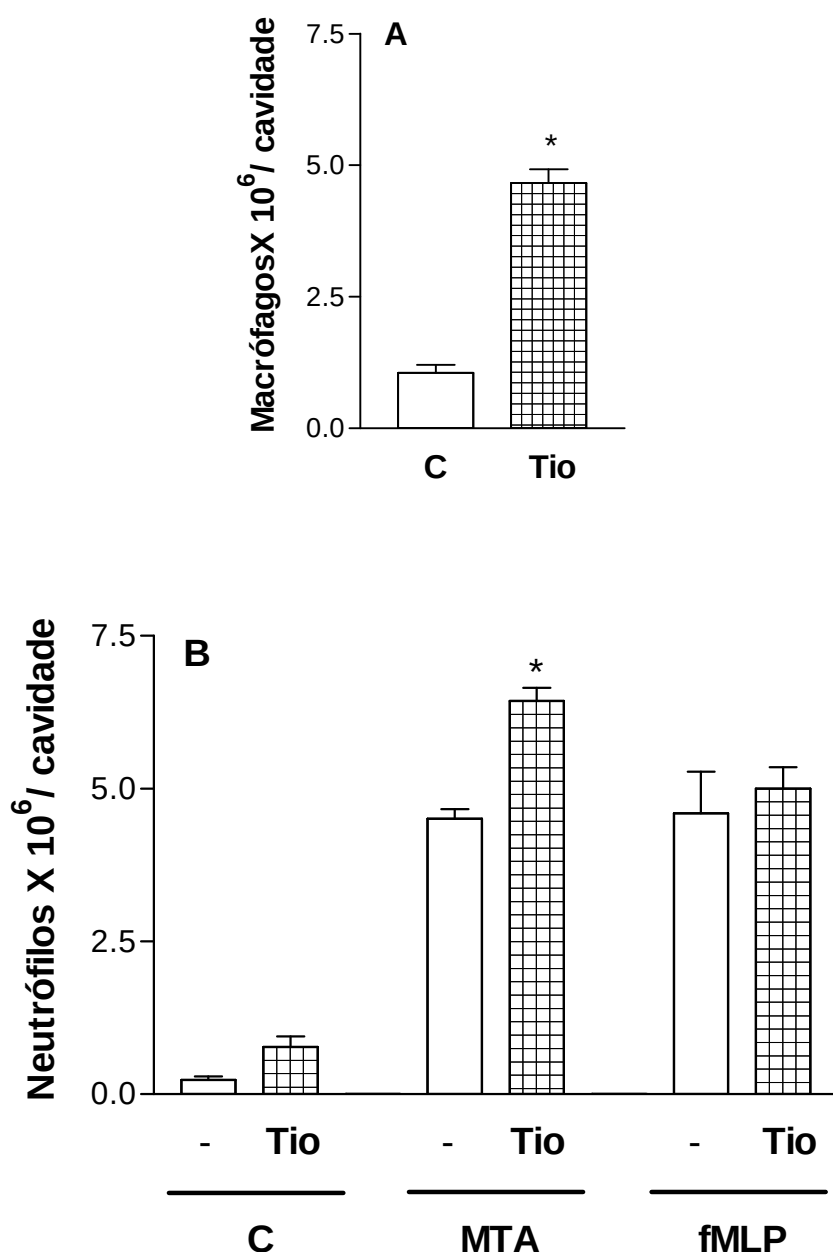


FIGURA 4: Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo MTA. (Painel A) - O efeito do pré-tratamento dos animais com tioglicolato 3% sobre a população de macrófagos. (Painel B) - O efeito do pré-tratamento dos animais com tioglicolato a 3% sobre a migração de neutrófilos induzida por MTA e fMLP. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 h após a injeção de MTA (50 mg/ cav) e fMLP (100 nmol/ cav). (C) - grupo controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

5 Influência da depleção de mastócitos dos animais com composto 48/80 sobre a migração de neutrófilos induzida por MTA em camundongos

O composto 48/80 é um conhecido desgranulador de mastócitos, por isso foi utilizado para avaliar o papel dos mastócitos na migração de neutrófilos. Observou-se que o composto 48/80 foi capaz de reduzir a população de mastócitos em cerca de 75% quando comparada com o grupo controle (figura 5A). Essa diminuição da população de mastócitos foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. No entanto, não alterou a migração de neutrófilos induzida pelo fMLP (figura 5B).

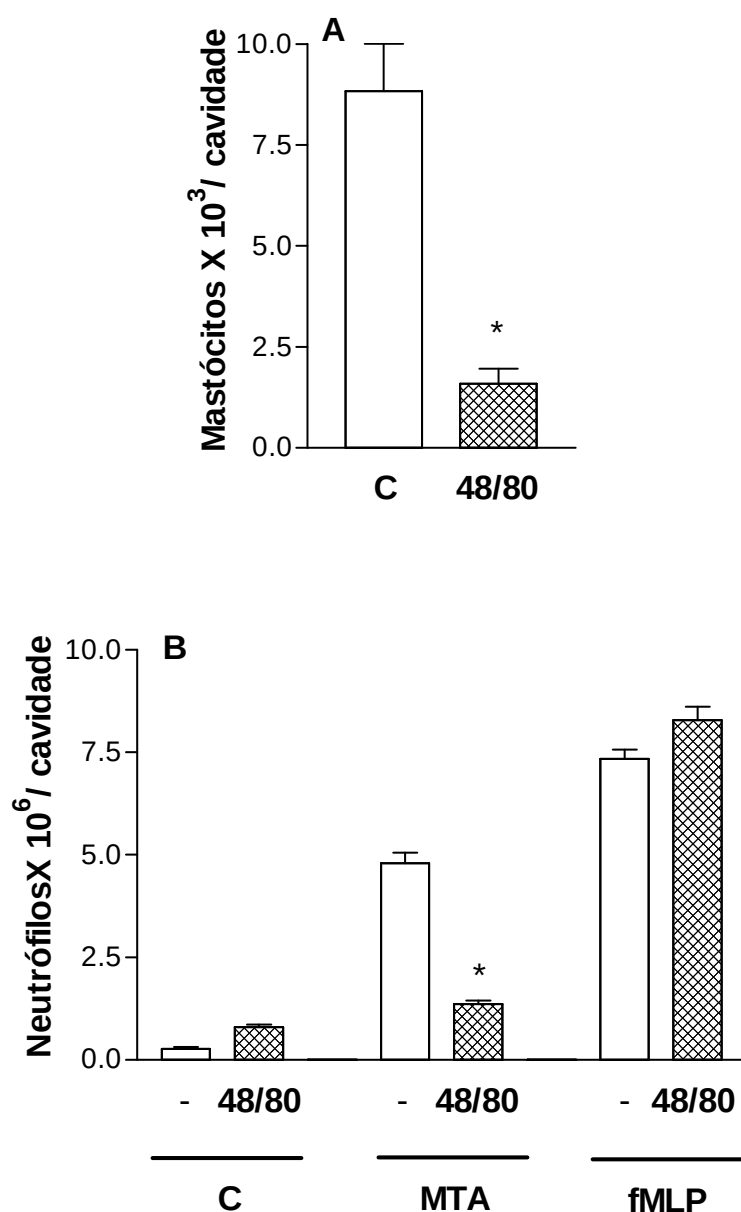


FIGURA 5: Influência da depleção de mastócitos com composto 48/80 sobre a migração de neutrófilos induzida por MTA. (Painel A) - O efeito do pré-tratamento com composto 48/80 sobre a população de mastócitos para cavidade peritoneal de camundongo. (Painel B) - O efeito do pré-tratamento com composto 48/80 sobre a migração de neutrófilos induzida por MTA (50 mg/ cav) e fMLP (100 nmol/ cav). (C) - grupo controle. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após a injeção do estímulo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

6 Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para bolha de ar subcutânea em camundongo

Visto que a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos induzida pelo MTA é dependente de mastócitos, foi realizado um ensaio experimental, onde o MTA foi injetado em uma bolha de ar subcutânea. Este ensaio foi realizado para confirmar a participação de mastócitos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA, já que nesta cavidade não há mastócitos, mas uma população de macrófagos e fibroblastos e microcirculação ativa (SEDWICH; LEE, 1986). Os dados mostram que o MTA induziu uma menor migração de neutrófilos para bolha de ar em relação à cavidade peritoneal (figura 6).

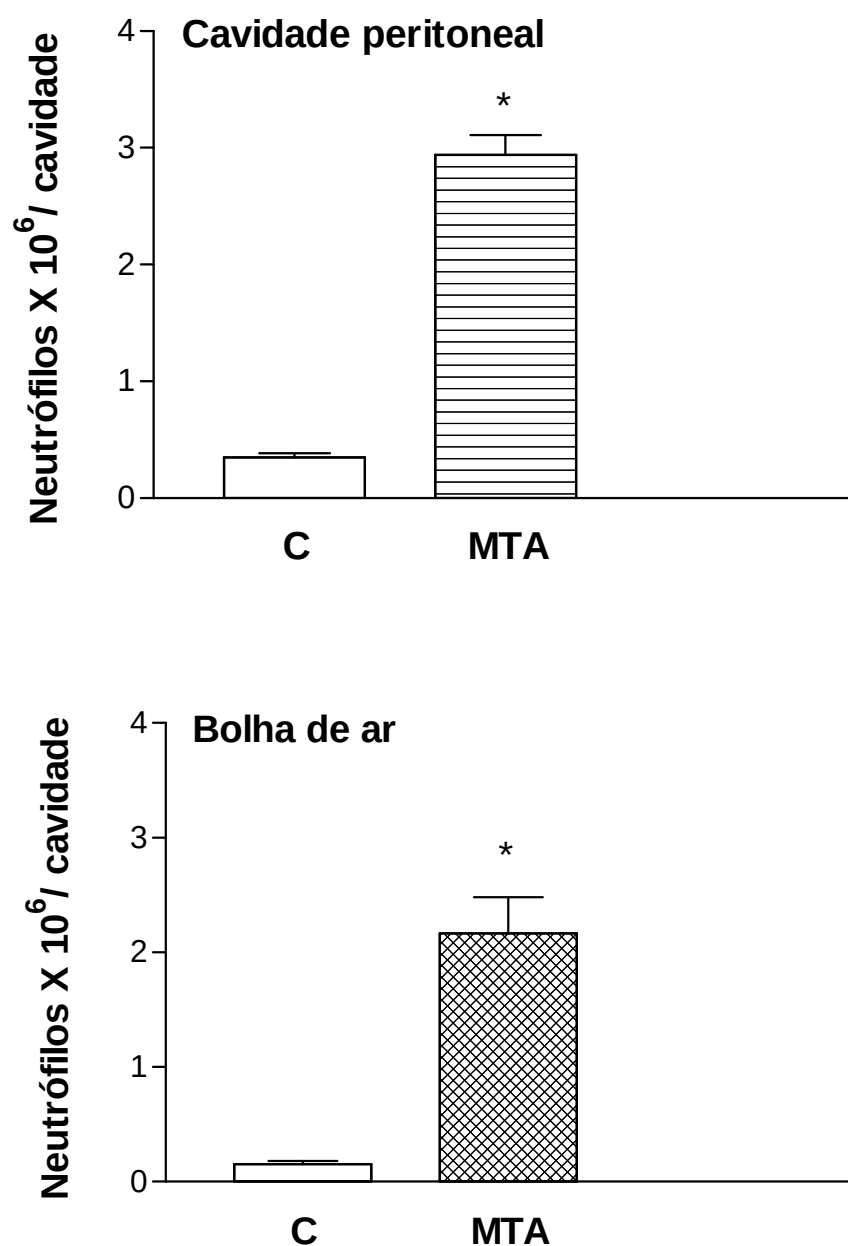


Figura 6: Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para bolha de ar subcutânea e cavidade peritoneal em camundongos. Os animais receberam uma injeção de MTA 50 mg/mL tanto na cavidade peritoneal quanto na bolha de ar. (C) - grupo controle. A migração foi avaliada após 6 h da injeção do estímulo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

7 Identificação da atividade quimiotática para neutrófilos liberada de mastócitos e macrófagos estimulados com MTA *in vitro*

A identificação das células produtoras dos fatores quimiotáticos para neutrófilos, bem como dos mecanismos envolvidos na liberação destes fatores é importante. No processo inflamatório, é sabido que após um determinado estímulo no tecido, são gerados mediadores inflamatórios no líquido tecidual ou pelas células residentes. Desta forma, investigamos quais os mediadores liberados pelas células residentes que estão envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA. Para isso, macrófagos peritoneais e mastócitos provenientes de cultura de células da medula óssea de camundongos foram incubados com MTA (50 mg/mL). Para testarmos a capacidade destes sobrenadantes de induzir migração de neutrófilos para cavidade peritoneal, estes sobrenadantes foram injetados na cavidade peritoneal de animais normais. Observamos que tanto os sobrenadantes de mastócitos quanto de macrófagos estimulados com MTA induziram uma significativa migração de neutrófilos após 6 h, quando comparado com o grupo controle (mastócitos e macrófagos incubados com meio de cultura) (figura 7).

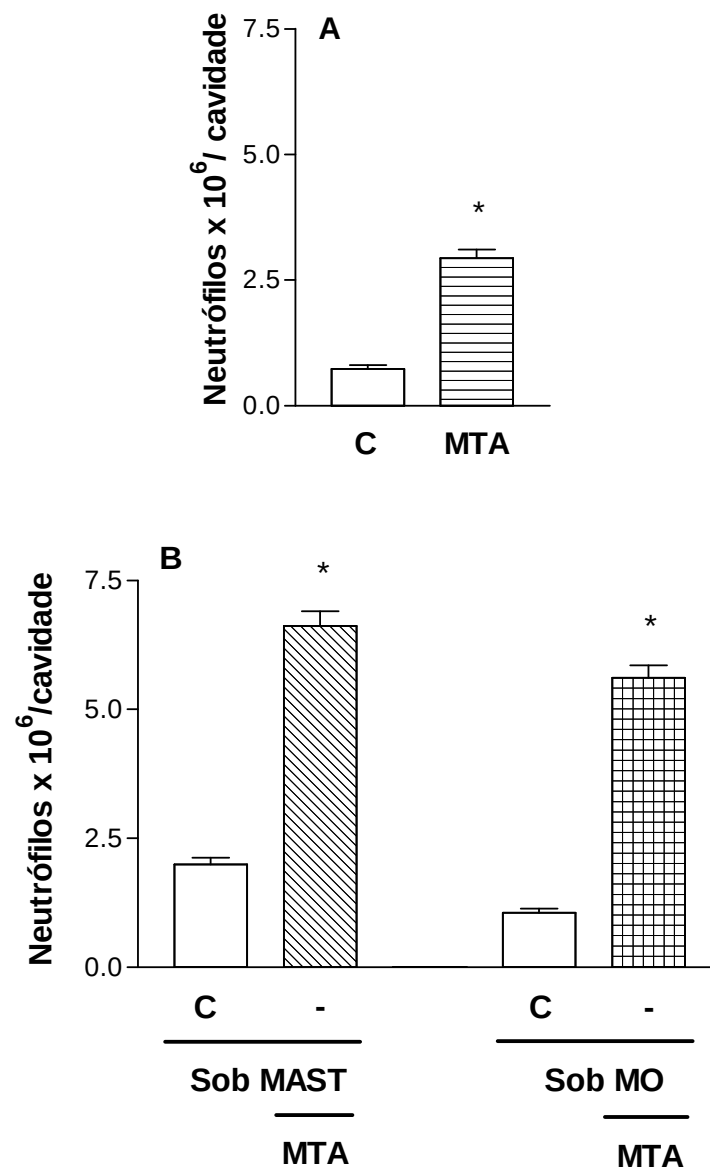


FIGURA 7: Efeito da atividade quimiotática do sobrenadante de mastócitos (sobMAST) e macrófagos (sobMO) estimulados com MTA. (Painel A) – Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. (Painel B) - Mastócitos (3×10^6) e macrófagos (10^6) de camundongos foram estimulados com MTA (50 mg/mL) durante 90 minutos e o sobrenadante (0,5 mL) foi injetado na cavidade peritoneal de animais normais. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 h após a injeção do estímulo. (C) - grupo controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

8- Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por macrófagos estimulados por MTA *in vitro*

Como observamos anteriormente, os macrófagos provenientes da cavidade peritoneal de camundongos quando estimulados com MTA foram capazes de liberar um fator quimiotático para neutrófilos (figura 7). Desta forma, fomos investigar qual o mediador que está envolvido neste processo utilizando como ferramenta farmacológica drogas antiinflamatórias tais como dexametasona, um glicocorticoide, o BWA4C, inibidor da 5-lipoxigenase e o U75302, antagonista de receptor de LTB₄. O pré-tratamento destas células com a dexametasona (10 µM), BWA4C (100 µM) e U75302 (10 µM) foi capaz de inibir a liberação de fator quimiotático para neutrófilos (figura 8).

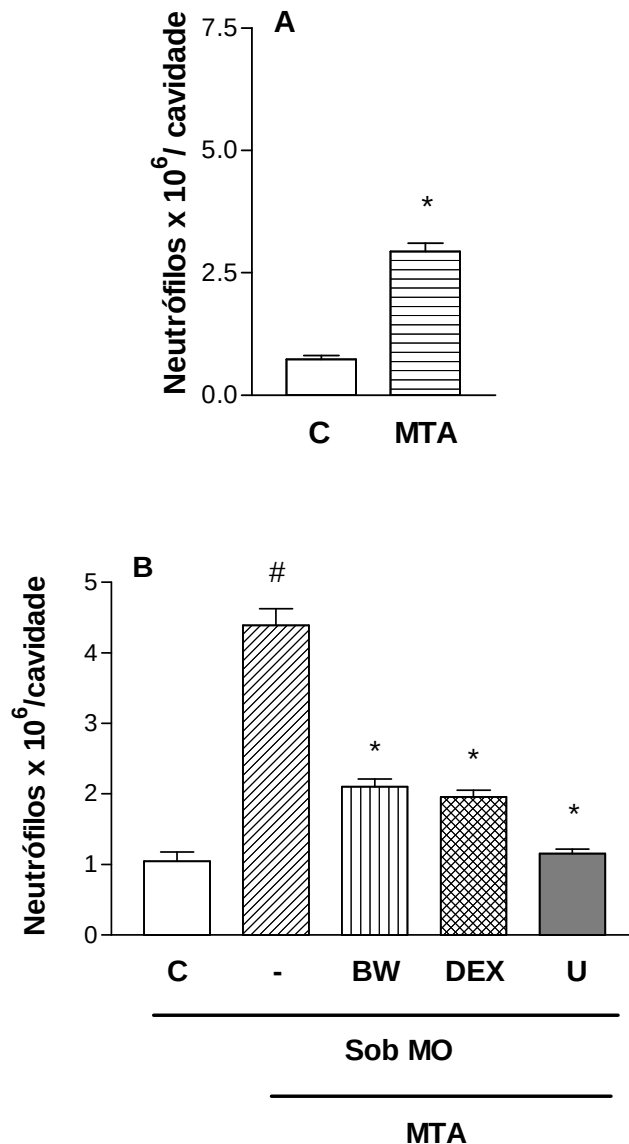


FIGURA 8: Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por macrófagos. (Painel A) - Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. (Painel B) - Macrófagos (10^6 /poço) foram pré-tratados 30 min antes com dexametasona ($10 \mu\text{M}$), BWA4C ($100 \mu\text{M}$) e U75302 ($10 \mu\text{M}$) e estimulados com MTA (50 mg/mL). O sobrenadante ($0,5 \text{ mL}$) foi injetado na cavidade peritoneal de animais normais. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 h após a injeção do estímulo. (C) - grupo controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao MTA (ANOVA com correção de Bonferroni).

9 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por mastócitos estimulados por MTA *in vitro*

Como observamos anteriormente, os mastócitos provenientes da medula óssea de camundongos quando estimulados com MTA foram capazes de liberar um fator quimiotático para neutrófilos (figura 7). Desta forma, fomos investigar qual o mediador que está envolvido neste processo utilizando como ferramenta farmacológica drogas antiinflamatórias tais como: dexametasona, um glicocorticóide, o BWA4C, inibidor da 5-lipoxigenase e o U75302, antagonista de receptor de LTB₄. O pré-tratamento das células com a dexametasona (10 µM), BWA4C (100 µM) e U75302 (10 µM) foram capazes de inibir de maneira significativa a liberação de fator quimiotático para neutrófilos (figura 9).

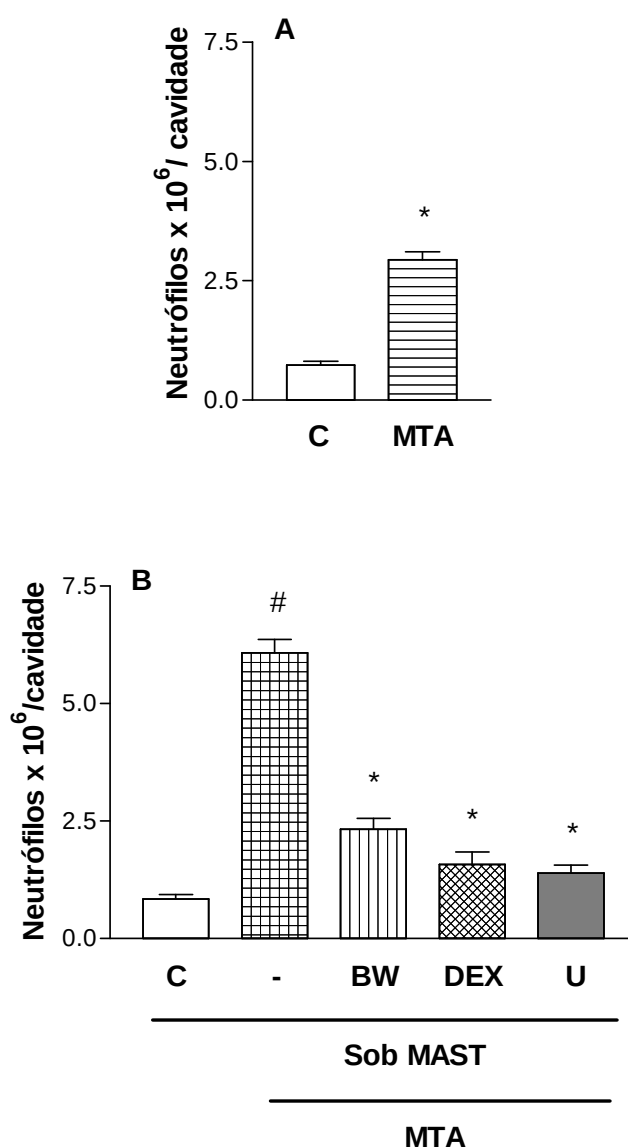


FIGURA 9: Efeito das drogas antiinflamatórias sobre a liberação do fator quimiotático para neutrófilos por mastócitos. (Painel A) - Migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. (Painel B) - Mastócitos (3×10^6 /poço) foram pré-tratados 30 min antes com dexametasona ($10 \mu\text{M}$), BWA4C ($100 \mu\text{M}$) e U75302 ($10 \mu\text{M}$) e estimulados com MTA (50 mg/mL). O sobrenadante ($0,5 \text{ mL}$) foi injetado na cavidade peritoneal de animais normais. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 h após a injeção do estímulo. (C) - grupo controle. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao MTA (ANOVA com correção de Bonferroni).

10- Expressão de IL-1 β , MIP-2 e 5-LO por macrófagos estimulados com MTA

Como observado anteriormente, macrófagos liberam fator quimiotático para neutrófilos e este fator é inibido quando os macrófagos foram pré-tratados com dexametasona, BWA4C e U75302. Além disso, observamos que no exsudato da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com MTA foi encontrado IL-1 β e MIP-2, mediadores inflamatórios, que são quimiotáticos para neutrófilos. Assim, investigamos se macrófagos quando estimulados com MTA seriam capazes de expressar MIP-2, IL-1 β e 5-LO. Os resultados mostraram que macrófagos quando estimulados com MTA aumenta a expressão de MIP-2, IL-1 β e 5-LO (figura 10).

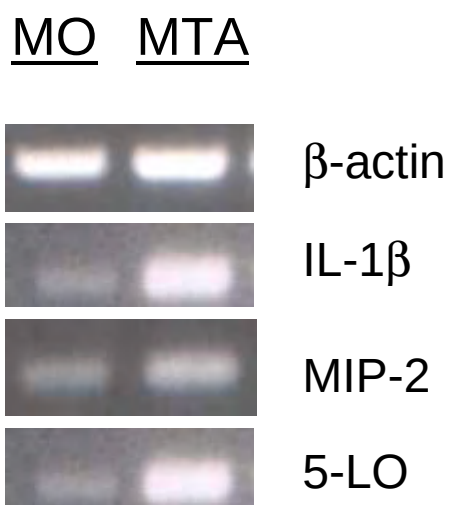


Figura 10: Expressão de RNAm para MIP-2, IL-1 β e 5-LO de macrófagos estimulados por MTA. Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos (1×10^6) foram estimulados durante 1 hora e meia com MTA (50 mg/mL). O RNA total foi extraído sendo avaliada a expressão de RNAm pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose com os produtos da PCR para detecção de MIP-2 (355 pb), IL-1 β (380 pb), 5-LO (332 pb) e β -actina (345 pb).

11- Expressão de IL-1 β , MIP-2 e 5-LO por mastócitos estimulados com MTA

Como observado anteriormente, mastócitos liberam fator quimiotático para neutrófilos e este fator é inibido quando os mastócitos foram pré-tratados com dexametasona, BWA4C e U75302. Além disso, observamos que no exsudato da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com MTA foi encontrado IL-1 β e MIP-2, mediadores inflamatórios, que são quimiotáticos para neutrófilos. Assim, investigamos se mastócitos quando estimulados com MTA seriam capazes de expressar MIP-2, IL-1 β e 5-LO. Os resultados mostraram que mastócitos quando estimulados com MTA passam a expressar MIP-2, IL-1 β e 5-LO (figura 11).

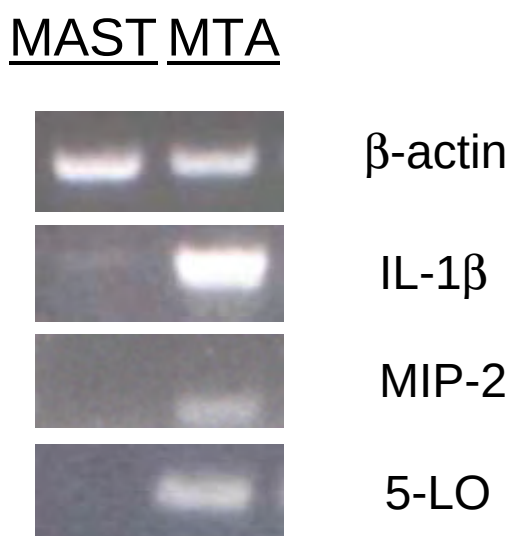


Figura 11: Expressão de RNAm para MIP-2, IL-1 β e 5-LO de mastócitos estimulados por MTA. Mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos (3×10^6) foram estimulados durante 1 hora e meia com MTA (50 mg/mL). O RNA total foi extraído sendo avaliada a expressão de RNAm pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose com os produtos da PCR para detecção de MIP-2 (355 pb), IL-1 β (380 pb), 5-LO (332 pb) e β -actina (345 pb).

Discussão

5 Discussão

O MTA tem sido utilizado com frequência na Odontologia, devido a propriedades que favorecem o processo de reparo. O óxido de cálcio presente no MTA, quando em contato com a água, seria convertido em hidróxido de cálcio que, em contato com os fluidos teciduais, se dissociaria em íons Ca^{2+} e OH^- . Os íons cálcio, reagindo com o CO_2 dos tecidos dariam origem às granulações de calcita, gerando o acúmulo de fibronectina, que por sua vez propiciaria a migração, adesão e diferenciação celular, com conseqüente formação de tecido duro (HOLLAND *et al.*, 1999b). Essa proteína, a fibronectina, é produzida por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais e pertence a um grupo de moléculas responsáveis pela migração, adesão e diferenciação celular de células pulpares e periodontais, que sintetizam e depositam colágeno tipo I, dando origem à matriz extracelular (TROWBRIDGE; EMLING, 1996). Ela também poderia influenciar a diferenciação de células pulpares em odontoblastos, ou células do periodonto, em cementoblastos, responsáveis principais pela deposição de minerais (BERNABÉ; HOLLAND, 2003).

A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória. A inflamação é uma tentativa do organismo se defender das agressões que podem ser de origem física, química ou biológica visando à eliminação do agente agressor. A seguir, este processo de defesa evolui no sentido de reparar os danos teciduais causados tanto pelo agente flogógeno, como pelas reações inerentes à defesa do organismo, através de outra série de reações, que compreendem, agora, o processo de reparo. O processo inflamatório está intimamente relacionado com o de reparo (TAKAHASHI, 1998; ROBBINS *et al.*, 1991).

Estas reações de defesa do organismo envolvem várias funções regulatórias e diversos mediadores (TROWBRIDGE; EMILING, 1996). Elas se caracterizam pela migração celular que apresenta predominância de tipo celular dependendo da natureza do estímulo. A resposta inflamatória do MTA frente aos diferentes tecidos tem sido avaliada, contudo, existem poucos dados de literatura que relatam os eventos envolvidos no processo inflamatório, eventos esses responsáveis pela migração celular para o local da lesão quando o MTA é utilizado e o passo inicial para que ocorra o processo de reparo. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a migração celular para o foco inflamatório, os diferentes mediadores químicos que estão envolvidos nesse recrutamento e o papel das células residentes nesse processo. O modelo experimental escolhido para realização dos experimentos foi a cavidade peritoneal de camundongos.

O uso da cavidade peritoneal de camundongos como modelo experimental tem sido descrito em diversos trabalhos (FACCIOLI *et al.*, 1990; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2004; CANETTI *et al.*, 2001; DESOUZA *et al.*, 2002; KOLACZKOWSKA *et al.*, 2006). O fato do MTA ser utilizado na cavidade oral não invalida o estudo, visto que a cavidade peritoneal também é muito vascularizada sendo o fluido peritoneal dos camundongos excelente para o estudo dos leucócitos extravasados e mediadores liberados devido a fatores como: o número de células livres do fluido peritoneal é completamente constante em camundongos não estimulados e os camundongos parecem depender mais de fatores celulares que humorais. Além disso, o fluido peritoneal do camundongo não estimulado contém poucos neutrófilos, fato que facilita detectar e medir o influxo de qualquer número de células (MARTINS, 1989).

Os resultados do presente trabalho demonstram que o MTA foi capaz de induzir uma migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos de uma maneira dose-dependente. Podemos observar um recrutamento significativo de neutrófilos na dose de 50 mg/mL. Em relação à cinética de migração, o pico de recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal foi observado 6 horas após a administração do estímulo, diminuindo 48 horas após. Apesar de não observamos recrutamento de células mononucleares 6 horas após, verificamos que 48 horas após a injeção do estímulo ocorreu o pico de migração de células mononucleares. Semelhantemente à cinética de migração de neutrófilos evidenciada em nosso modelo experimental, SILVA *et al.*, 2004, e KOLACZKOWSKA *et al.*, 2006, observaram que o pico de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal foi 6 horas após a administração de proteínas dentinárias e zimozan, respectivamente.

Na inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas (COLLINS, 2000). Essa migração celular tem sido alvo de diversos estudos, empregando-se metodologias variadas e outros estímulos que não o MTA.

Apesar de existirem vários trabalhos de avaliação histológica do comportamento do MTA em tecido subcutâneo de ratos avaliando as características do processo inflamatório, os tempos utilizados foram a partir de 7 dias (HOLLAND *et al.*, 1999b; MOTTA *et al.*, 2003; YALTIRIK *et al.*, 2004), onde foi encontrado um processo inflamatório crônico com predomínio de células mononucleares, principalmente de macrófagos e fibroblastos. Na literatura, não existem relatos do uso do MTA em subcutâneo de ratos no tempo de 6 horas, já que o processo inflamatório gerado pelo MTA poderia ser confundido com a inflamação gerada pela ferida cirúrgica. É conveniente lembrar que o modelo do subcutâneo de ratos e a

cavidade peritoneal de camundongos são modelos distintos podendo ter padrões de infiltrado inflamatório diferentes, porém a cavidade peritoneal é um modelo válido para o estudo do recrutamento celular. No modelo escolhido para a realização do estudo foi encontrada inflamação aguda no tempo de 6 horas, porém com 48 horas já havia o predomínio de mononucleares. Este processo inflamatório inicial é importante para que se tenha a liberação de mediadores inflamatórios e ativação de outras células para que comece a ocorrer o processo de reparo tecidual.

Clinicamente, o MTA tem sido empregado com água destilada. Deve ser ressaltado que a água utilizada para a reação de hidratação com MTA poderá influenciar suas propriedades físicas, químicas e biológicas, (ALMEIDA FILHO, 2002). Dessa forma, em nosso estudo a suspensão de MTA foi feita utilizando-se água destilada. O PBS, quando utilizado junto ao MTA poderia alterar as suas propriedades e impedir a avaliação adequada da resposta inflamatória. No entanto, a água destilada não foi utilizada no grupo controle, pois promoveria a lise celular, impedindo a avaliação adequada da resposta inflamatória, para este grupo foi utilizado o PBS.

Visto que o MTA induz uma resposta inflamatória, de acordo com os dados descritos acima, foram investigados quais os mediadores químicos poderiam ser responsáveis pela migração dos neutrófilos induzida pelo MTA no modelo experimental utilizado. Para tanto, foi utilizado como ferramenta farmacológica, o pré-tratamento dos animais com drogas antiinflamatórias. Estes resultados demonstraram que a migração de neutrófilos induzida pelo MTA não foi inibida pelo pré-tratamento dos animais com a Indometacina. Diferentemente, a Dexametasona, o U75302 e o BWA4C foram efetivos neste processo.

A Indometacina é um antiinflamatório não-esteroidal que atua inibindo a síntese de prostaglandinas e tromboxanos, mediante a inativação da enzima ciclooxigenase (LANDS, 1985; GILROY *et al.*, 1998). As prostaglandinas são geradas pelos tecidos e vasos sangüíneos locais, apresentam diferentes funções e atuam mediando ou modulando a resposta inflamatória podendo atuar como vasodilatadores ou agente quimiotático para neutrófilos (COLLINS, 2000)

A inibição da síntese de prostaglandinas, através do uso da Indometacina, que bloqueia a produção de eicosanóides, não inibiu a migração de neutrófilos para o local da inflamação. Corroborando os resultados deste estudo, outros dados da literatura mostraram que o pré-tratamento dos animais com Indometacina também não modificou a migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos para bolha de ar subcutânea induzida pela IL-1 não foi inibida pela Indometacina (1mg/Kg) (PERRETTI; FLOWER, 1993). A Indometacina (5mg/Kg) também não se mostrou efetiva em inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos, após indução com enterotoxina tipo A (DESOUZA *et al.*, 2001). A migração de neutrófilos para focos de infecção devido a perfurações ou ligadura no intestino de ratos, também não foi inibida pelo uso da Indometacina (RIOS SANTOS *et al.*, 2003). A inibição da migração de neutrófilos não foi observada quando da utilização de sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias como estímulo, em cavidade peritoneal de camundongos (SILVA *et al.*, 2004). A Indometacina também não modificou de maneira significativa a migração de neutrófilos para cavidade articular de ratos, utilizando como estímulo a ovalbumina (BOMBINI *et al.*, 2004). A migração de neutrófilos para bolha de ar subcutânea induzida pela IL-8 não foi inibida pelo tratamento dos animais com a Indometacina (PERRETTI *et al.*, 1994). Desta forma, produtos da ciclooxigenase parecem não estar envolvidos na migração de

neutrófilos induzida pelo MTA, já que a Indometacina não foi capaz de inibir esta migração no modelo estudado.

A outra via do metabolismo do ácido araquidônico ocorre através da ação das enzimas lipoxigenases (GERRITSEN, 1996). A enzima 5-LO é a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos, e seu principal produto é a 5-HETE (ácido hidroieicosatetraenóico), que posteriormente é transformado em LTA₄. Este por ação de enzimas específicas é transformado nos leucotrienos B₄, C₄, D₄, e E₄ (LAM *et al.*, 1990).

Quanto às estratégias terapêuticas para inibir os leucotrienos utilizam-se dois grupos de drogas: as inibidoras da síntese de leucotrienos pela inibição da síntese de 5-lipoxigenase e as que atuam como antagonistas de receptores de leucotrieno.

Com o objetivo de determinar se os mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido pelo MTA são resultantes da metabolização do ácido araquidônico pela via lipoxigenase, foram utilizados o BWA4C e U75302, inibidor da 5-LO e antagonista de receptor de LTB₄ (BLT1), respectivamente. O mecanismo de ação do BWA4C ocorre semelhantemente ao do MK 886 por meio da inibição da ligação da enzima 5-LO citosólica à proteína FLAP (Proteína ativadora da 5-lipoxigenase) localizada na membrana plasmática (SAMUELSSON, *et al.*, 1991). Possivelmente, o LTB₄ está envolvido no recrutamento de neutrófilos induzido pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos, já que, o BWA4C inibiu de maneira significativa a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. Semelhante aos nossos resultados, o uso do BWA4C inibiu a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos, induzida por LTB₄, fMLP, C5a e toxina A (RIBEIRO *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 1997).

A migração de neutrófilos induzida pelo MTA também foi inibida em animais pré-tratados por U75302. O uso do U75302 em estudos *in vivo* ainda foi pouco investigado, porém há alguns estudos *in vitro* demonstrando o envolvimento do receptor LTB₄ (BLT1) na mobilização de cálcio induzida pelo PAF. Observou-se que o pré-tratamento com um antagonista específico de BLT1 (U75302) levou à inibição parcial da liberação de cálcio induzido pelo PAF em neutrófilos humanos (GAUDREAULT, *et al.* 2005). Estes dados sugerem que tanto o BWA4C quanto o U75302 são importantes inibidores da resposta inflamatória mediada pelo LTB₄.

A participação do LTB₄ em nosso modelo experimental está em acordo com outros dados da literatura, os quais demonstraram que o LTB₄ é um mediador lípidico potente envolvido nas reações inflamatórias e alérgicas, bem como modulador das respostas imunes. Esta molécula tem a capacidade quimiotática para neutrófilos e também propicia aumento de polimorfonucleares em tecidos através da inibição da apoptose (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980). O LTB₄ estimula várias funções de leucócitos, incluindo aderência, fagocitose, secreção de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais (SERHAN *et al.*, 1996; MANCUSO *et al.*, 1998). Ele também é capaz de estimular a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias podendo aumentar ou prolongar a inflamação tecidual (CANETTI *et al.*, 2001; CROOKS; STOCKLEY, 1998). A ação do LTB₄ é mediada através da interação com seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Dois GPCRs foram identificados (BLT1 e BLT2) (YOKOMIZO *et al.*, 2000) e os efeitos descritos acima são mediados principalmente pelo receptor BLT1.

A presença de LTB₄ em doenças inflamatórias humanas tem sido relatada em diferentes modelos em que ocorre migração de neutrófilos, tal como artrite reumatóide, doença intestinal inflamatória e doença periodontal (DAVIDSON *et al.*,

1983; EMINGIL *et al.*, 2001). O recrutamento excessivo de neutrófilos e a ativação pelo LTB₄ podem causar prejuízo tecidual, contribuindo para a perpetuação e progressão da doença e ou ativação de células estruturais tais como fibroblastos e células endoteliais iniciando o processo de reparo tecidual (CROOKS; STOCKLEY, 1998).

A migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos também foi inibida pela dexametasona, um glicocorticóide que entre outros efeitos impede a ação da fosfolipase A₂, que é uma enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico da membrana celular. Este efeito inibitório dos glicocorticóides é provavelmente exercido por meio da produção de proteínas com atividade anti-fosfolipase A₂, denominadas de lipocortinas, as quais inibem a produção de eicosanóides como leucotrienos e fosfolipídeos modificados como o PAF (SAUTEBIN *et al.*, 1992). Além de sua ação sobre a fosfolipase A₂, os glicocorticóides também inibem fatores nucleares envolvidos na transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias como o NF-κB e AP-1. Com relação aos mecanismos pelos quais a dexametasona é capaz de inibir a translocação do fator nuclear para o núcleo, podemos ressaltar a indução da síntese de I-κB, substância essa capaz de formar um complexo com o NF-κB, inativando-o (SCHEINMAN, 1995; AUPHAN, 1995). Dessa forma, os glicocorticóides podem inibir a migração de neutrófilos pela inibição da geração de mediadores tais como quimiocinas, citocinas, LTB₄ e a expressão de moléculas de adesão sob as células endoteliais (PARENTE *et al.*, 1992; CRONSTEIN *et al.*, 1992). Similar aos nossos resultados o pré-tratamento com esta droga também inibiu a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos, entre eles: IL-1 (PERRETTI; FLOWER, 1993), IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 1991; PERRETI *et al.*, 1994), LTB₄, fMLP e zimozan (RIBEIRO *et al.*, 1997),

ovalbumina (CANETTI *et al.*, 2001), sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias (SILVA *et al.*, 2004). Essa inibição também foi observada em um foco inflamatório em espaço articular de joelho de ratos induzido pela ovalbumina (BOMBINI *et al.*, 2004).

Sabendo-se que a dexametasona inibe a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos, isto sugere que possa estar ocorrendo a participação de citocinas e quimiocinas no processo, por isso, investigamos a liberação de IL-1 β e MIP-2 que são mediadores inflamatórios quimiotáticos para neutrófilos. Os resultados mostraram que no exsudato peritoneal de animais estimulados com MTA foram detectados níveis considerados elevados de IL-1 β e MIP-2.

As citocinas e quimiocinas contribuem para o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (ROT; ANDRIAN, 2004). Entre os produtos derivados do hospedeiro, as citocinas desempenham um papel chave na atração de leucócitos, bem como indutor potente de quimiocinas. Além disso, algumas citocinas como IL-1 e interferons que são induzidas por produtos virais ou bacterianos agem como ativadores primários da resposta imune, enquanto quimiocinas agem mais como mediadores secundários capazes de atrair células inflamatórias. Em resposta a infecções, citocinas e quimiocinas são produzidas simultaneamente e podem interagir com outros estimuladores ou inibidores da inflamação (GOUWY *et al.*, 2005).

As citocinas são neurotransmissores entre células em muitos processos fisiológicos e patológicos. Estas são plurifuncionais, modulam processos biológicos essenciais, são secretadas por uma grande variedade de tipos celulares, sendo capazes de regular a hematopoiese, inflamação e principalmente o crescimento e

diferenciação celular. Geralmente as citocinas atuam de forma parácrina (próximo às células que a produzem) ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem) (MONTENEGRO; FRANCO, 1999). IL-1 β é uma citocina que estimula a infiltração de neutrófilos, pode agir como mediador final ou através da indução e secreção de eicosanóides e quimiocinas (ZHANG *et al.*, 2001). Em estudo *in vivo* utilizando sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias como estímulo, também mostrou recrutamento de neutrófilos mediado pela produção de IL-1 β (SILVA *et al.*, 2004). Estudos *in vitro*, utilizando osteoblastos humanos, mostraram níveis elevados de IL-1 β na presença de MTA (KOH *et al.*, 1997; ABDULLAH *et al.*, 2002).

MIP-2 é a principal quimiocina CXC com a capacidade de atrair neutrófilos ao sítio inflamatório (TESSIER *et al.*, 1998). Muitos tipos celulares incluindo macrófagos, células endoteliais e mastócitos podem liberar MIP-2 (WOLPE *et al.*, 1989, LI *et al.*, 2000). Similar aos nossos resultados, MIP-2 também mediou a migração de neutrófilos induzida por sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias (SILVA *et al.*, 2004) e por LPS (KOPYDLOWSKI *et al.*, 1999).

Visto que a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos induzida pelo MTA é mediada pela liberação de IL-1 β , MIP-2 e derivados da enzima 5-LO, nosso objetivo seguinte foi investigar o papel das células residentes na migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos. Assim sendo, foram utilizadas algumas ferramentas experimentais tais como: aumento da população de macrófagos por tioglicolato e depleção da população de mastócitos residentes por um desgranulador de mastócitos, o composto 48/80.

Os resultados mostraram que a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida pelo MTA foi dependente de macrófagos, visto que o aumento da

população de macrófagos potencializou a migração de neutrófilos induzida pelo MTA de maneira estatisticamente significativa.

Os macrófagos desempenham um papel importante na defesa imune adquirida e inata na patogênese da inflamação (UNANUE, 1978). Além disso, macrófagos produzem muitas citocinas que promovem a iniciação, perpetuação, direção e até mesmo a inibição do processo de resposta imunológico (STASHENKO *et al.*, 1998; METZGER *et al.*, 2000). Também há muitas evidências de que macrófagos são importantes para produção de mediadores inflamatórios na reabsorção periapical e durante o processo de reabsorção fisiológica radicular (SASAKI *et al.*, 1990). Os resultados encontrados nesse estudo estão em acordo com dados de literatura, nos quais foram observados que macrófagos medeiam a migração de neutrófilos quando estimulados por proteínas dentinárias (SILVA *et al.*, 2005), LTB₄, (RIBEIRO *et al.*, 1997) e enterotoxina tipo A (DESOUZA *et al.*, 2001).

Além da participação dos macrófagos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos, também foi investigado o envolvimento dos mastócitos nesta migração. Observou-se que a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos foi dependente de mastócitos, visto que a depleção de mastócitos pelo composto 48/80 inibiu a migração de neutrófilos induzida pelo MTA.

Os mastócitos desempenham um papel fisiopatológico importante em muitas doenças inflamatórias como reações de hipersensibilidade, injúrias isquêmicas, artrite reumatóide e doença periodontal. Além disso, mastócitos são criticamente envolvidos na resposta defensiva contra agentes flogógenos (SCHRAMM; TORLACIUS, 2004). Ao serem ativados, os mastócitos liberam metabólitos do ácido araquidônico, incluindo leucotrienos e prostaglandinas (RAUD, 1989). Também é

notório o aumento no número de mastócitos em polpas inflamadas e região periapical, tendo implicações na reabsorção periapical, possivelmente pela interferência na atividade osteoclástica (KABASHIMA *et al.*, 2002).

Estudos na literatura também evidenciaram que a migração de neutrófilos induzida por proteínas dentinárias (SILVA *et al.*, 2005), LTB₄, (RIBEIRO *et al.*, 1997) e IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 1991,1997) ocorre por um mecanismo dependente de mastócitos residentes, confirmando a importante participação destas células em liberar mediadores envolvidos no processo inflamatório.

No sentido de confirmar a participação de mastócitos na migração de neutrófilos induzida pelo MTA, foi utilizado o modelo experimental da bolha de ar subcutânea. Neste modelo o MTA induziu uma migração de neutrófilos menor comparada à cavidade peritoneal, já que na bolha de ar não há mastócitos, mas uma população de macrófagos e fibroblastos e uma microcirculação ativa (SEDGWICH; LEE, 1986; BALASUBRAMANIAM; HURLEY, 1983; EDWARDS *et al.*, 1981). Assim sendo, podemos sugerir que o recrutamento de neutrófilos induzido pelo MTA foi dependente de mastócitos e também de macrófagos residentes.

Os resultados demonstraram a participação de células residentes na migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos, porém o recrutamento de neutrófilos induzido pelo MTA para esta cavidade foi inibido após o pré-tratamento dos animais com BWA4C, U75302 e dexametasona. Esta inibição reforça a idéia de que o MTA estimula macrófagos e mastócitos a liberar LTB₄, citocinas e quimiocinas capazes de induzir o recrutamento de neutrófilos. Citocinas e LTB₄, principalmente de macrófagos e mastócitos induzem migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e têm sido envolvidos nos aspectos de resposta imune e inflamatória (FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990).

Assim sendo, procuramos investigar quais os mediadores liberados nos sobrenadantes de mastócitos e macrófagos estimulados pelo MTA estariam envolvidos na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos. Observamos que a atividade quimiotática para neutrófilos de mastócitos e macrófagos estimulados por MTA foi inibida pelo pré-tratamento das células com BWA4C e U75302. Estes resultados foram semelhantes aos observados *in vivo*, sugerindo a participação de produtos da via lipoxigenase na migração de neutrófilos pelo MTA e sugerindo ainda que possivelmente os macrófagos e mastócitos estão sendo estimulados pelo MTA para liberação de LTB₄. Dados de literatura têm demonstrado que macrófagos e mastócitos são capazes de liberar LTB₄ (MENCIA-HUERTA *et al.*, 1983; TEIXEIRA; HELLEWELL, 1994; FELS *et al.*, 1982; CONTI *et al.*, 1989).

A dexametasona também inibiu a liberação do fator quimiotático para neutrófilos liberado nos sobrenadantes de mastócitos e macrófagos estimulados por MTA. Sabe-se que este glicocorticoide além de inibir a fosfolipase A₂, também inibe a síntese e conseqüente liberação de citocinas e quimiocinas e também alguns de seus efeitos (MUNCK *et al.*, 1990). Isto sugere que os macrófagos e os mastócitos estimulados por MTA são capazes de produzir citocinas e/ou quimiocinas que são quimiotáticas para neutrófilos. A migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de mastócitos também foi reduzida pelo pré-tratamento com dexametasona quando essas células foram estimuladas por LTB₄ (RIBEIRO *et al.*, 1997) e IL-8 (RAMOS *et al.*, 2003). A migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos também foi reduzida pelo pré-tratamento com dexametasona quando as células foram estimuladas com LTB₄ (RIBEIRO *et al.*, 1997) e proteínas dentinárias (SILVA *et al.*, 2005).

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos foi dependente de macrófagos e mastócitos residentes. Possivelmente esses macrófagos e mastócitos residentes estejam liberando IL-1 β e MIP-2, visto que detectamos níveis desses mediadores no exsudato da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com MTA e ambos são quimiotáticas para neutrófilos. Dessa forma, procuramos investigar se os macrófagos e os mastócitos residentes seriam responsáveis pela liberação desses mediadores. Assim, avaliamos a expressão do RNA mensageiro para IL-1 β e MIP-2. Observamos que macrófagos e mastócitos estimulados por MTA foram capazes de expressar RNA mensageiro para IL-1 β e MIP-2, confirmando nossa hipótese.

Como foi demonstrado que o LTB₄ está envolvido na migração de neutrófilos induzida pelo MTA e a 5-LO é a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos, procuramos verificar se macrófagos e mastócitos também seriam capazes de expressar a enzima 5-LO. Observamos que macrófagos e mastócitos estimulados com MTA expressam 5-LO e conseqüentemente estariam liberando LTB₄.

Em conclusão, nossos dados demonstram que a migração de neutrófilos induzida pelo MTA para cavidade peritoneal de camundongos foi dependente de macrófagos e mastócitos residentes liberando IL-1 β , MIP-2 e LTB₄.

Os resultados obtidos em várias pesquisas favorecem o emprego do MTA na Odontologia devido às propriedades físicas, químicas e biológicas. A resposta do tecido frente ao material em contato com o mesmo é complexa e depende de vários fatores. A reabsorção óssea e sua subsequente formação dependem da interação entre osteoblastos e osteoclastos (MEGHJI, 1992). A interação entre estas células é governada por hormônios, fatores de crescimento e citocinas (MITCHELL *et al.*,

1999). Como o MTA tem a capacidade de estimular a liberação de citocinas de células ósseas, é capaz de formar tecido duro (KOH *et al.*, 1995). O MTA em contato com o tecido pulpar também forma ponte de dentina (SALAKO *et al.*, 2003). Além disso, estudos utilizando ligamento periodontal e fibroblastos gengivais foram capazes de expressar genes indicativos de reparo ósseo, bem como o de deposição de cimento, especialmente de fosfatase alcalina (BONSON *et al.*, 2003).

Portanto, para que se conheça o processo de reparo induzido pelo MTA é necessário entender o processo inflamatório de uma forma mais abrangente, já que o reparo inicia-se nas primeiras fases da inflamação. Durante este processo inflamatório inicial são liberados mediadores inflamatórios e ocorre ativação de outras células para que comece a ocorrer o processo de reparo tecidual. Desta forma, a importância de se investigar os mecanismos envolvidos no recrutamento celular induzido pelo MTA seria uma ferramenta necessária para elucidar os eventos iniciais do processo de reparo.

A hipótese provável deste estudo seria que o MTA estimularia macrófagos e mastócitos a produzirem IL-1 β , MIP-2 e LTB₄ que por sua vez induziriam migração de neutrófilos. Os neutrófilos ativados estimulariam a produção de mais IL-1 β , MIP-2 e LTB₄ que seriam capazes de ativar fibroblastos levando a produção de fibronectina e fibras colágenas que por sua vez levariam a migração, adesão e diferenciação celular com conseqüente formação de tecido duro.

Conc lusão

6 Conclusão

- O MTA induziu migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos.
- A indometacina, inibidor de COX, não inibiu a migração de neutrófilos, sugerindo que produtos da COX não estão envolvidos no processo.
- O BWA4C, inibidor da 5-lipoxigenase e o U75302, antagonista de receptor de leucotrieno, inibiram a migração de neutrófilos, sugerindo a participação de produtos da 5-LO.
- A dexametasona, um glicocorticóide, inibiu a migração de neutrófilos, sugerindo a participação de derivados do ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas no processo.
- A migração de neutrófilos foi dependente de macrófagos e mastócitos residentes, possivelmente estas células estejam liberando IL-1 β , MIP-2 e LTB₄.

Referências

Referências

ABDULLAH, D. et al. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. **Biomaterials**, v.23, n.19, p.4001-10, Oct. 2000.

ABEDI, H.R. et al. The use of mineral trioxide aggregate cement as direct pulp capping agent. **J Endod.**, v.22, n.4, p.199, 1996.

ADAMO, H.L. et al. A comparison of MTA, Super EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. **Int Endod J**, v.32, n.3, p.197-203, May. 1999.

AEINEHCHI, M. et al. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium trioxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **Int Endod J**, v.36, n.3, p.225-31, Mar. 2003.

AGAMY, H.A. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatr Dent**, v.26, n.2, p.302-9, Jul-Aug. 2004.

ALLEN, W.E. et al. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **J Cell Biol**, v.141, n.5, p.1147-57, Jun. 1998.

ALMEIDA FILHO, R. M.R. **MTA x Cimento de Portland: análise comparativa de algumas de suas propriedades químicas, físicas e biológicas**. 2002. Monografia (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2002.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ANSI-ADA document nº 41 for Biological Evaluation of Dental Materials. Chicago: ADA, 1982.

ANDELIN, W.E. et al. Microleakage of resected MTA. **J Endod**, v.28, n.8, p.573-4, Aug. 2002.

APAYDIN, E.S.; SHABAHANG, S.; TORABINEJAD, M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. **J Endod**, v.30, n.1, p.21-4, Jan. 2004.

AUPHAN, N. et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. **Science**, v.270, n.5234, p.286-90, 1995.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v.392, n.6676, p.565-8, Apr. 1998.

BALASUBRAMANIAM, G.S.; HURLEY, J.V. The structure and reactions of the microcirculation in a subcutaneous air pouch in the rat. **J Pathol**, v.151, n.2, p.139-146, Feb. 1983.

BALTO, H.A. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. **J Endod**, v.30, n.1, p.25-9, Jan. 2004.

BARJA-FIDALGO, C.; et al. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. **Inflammation**, v.16, n.1, p.1-12, Feb. 1992.

BATES, C.F.; CARNES, D.L.; DEL RIO, C.E. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **J Endod**, v.22, n.11, p.575-8, Nov. 1996.

BAZAN, J.F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. **Nature**, v.385, n.6617, p.640-4, Feb. 1997.

BERNABÉ, P.F.E.; HOLLAND, R. O emprego do MTA na cirurgia parodontológica. **Endonews**, v.2, p.2-5, 1999.

BERNABÉ, P.F.E.; HOLLAND, R. MTA e Cimento de Portland: considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: CARDOSO, R.J.A.; MACHADO, M.E.L. **Odontologia Arte e Conhecimento**. São Paulo: Artes Médicas, 2003. p. 225-264.

BERNABÉ, P.F.E. et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. **Brazilian Dental Journal** v.16, p. 149-55, 2005.

BICKEL M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. **J Periodontol**, v.64, p.456-60, 1993.

BOMBINI, G. et al. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur J Pharmacol**, v.496, n.1-3, p.197-204, Aug. 2004.

BONSON, S.; JEANSONNE, B.G.; LALLIER, T.E. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. **J Dent Res**, v.83, n.5, p.408-13, May. 2004.

BRADY, H.R. Potential vascular roles for lipoxins in "stop programs" of host defense and inflammation. **Trends Cardiovasc Med**, v.5, p.186-92, 1995.

CAMP, J.H. Pulpal therapy for primary and permanent teeth. **Dent Clin North Amer**, v.28, n.4, p.651-58, Oct., 1984.

CANETTI, C. et al. Tumor necrosis factor-alpha and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, v.134, n.8, p.1619-28, Dec. 2001.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.21, p.13926-31, Oct. 2002.

CHU, S.J. et al. In situ amplification of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in allergic airway inflammation and inhibition by leukotriene blockade. **J Immunol**, v. 165, n.8, p. 4640-8. 2000.

CINAMON, G.; et al. Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. **J Leukoc Biol**, v.69, n.6, p.860-6, Jun. 2001.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN R. S., KRUMAN V., COLLINS T. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2000. p.44-78.

CONTI, P. et al. The combination of IL-1 plus TNF causes greater generation of LTB₄, thromboxanes and aggregation on human macrophages than these compounds alone. **Prog Clin Biol Res**, v.89, p.541-5, 1989.

COSTA, C.A.S.; SOUZA, P.P.C. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela, C. **Metodologia Científica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005, p.213-230.

CRONSTEIN, B.N.; et al. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.21, p.9991-5, Nov. 1992.

CROOKS, S.W.; STOCKLEY, R.A. Leukotriene B₄. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, n.2, p.173-8, Feb. 1998.

CUMMINGS, G.R.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate (MTA) as an isolating barrier for internal bleaching. **J Endod**, v.21, n.4, p.228, 1995. (Abstract)

DAVIDSON, E.M.; RAE, S.A.; SMITH, M.J. Leukotriene B₄, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v.42, n.6, p.677-9, Dec. 1983.

DeGROOD, M.E. et al. A comparison of tissue reactions to Ketac-Fill and Amalgam. **J Endod**, v.21, n.2, p.65-9, Feb. 1995.

DESOUZA, I.A. et al. Mouse macrophages release a neutrophil chemotactic mediator following stimulation by staphylococcal enterotoxin type A. **Inflamm Res**, v.50, n.4, p.206-12, Apr. 2001.

DESOUZA, I.A. et al. Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic mediator in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice. **Toxicon**, v.40, n.12, p.1709-17, Dec. 2002.

DINARELLO, CA. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.8, n.4, p.253-65, Dec. 1997.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**, v.104, n.1, p.15-29, May. 1971.

DUARTE, M.A. et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.95, n.3, p.345-7, Mar. 2003.

ECONOMIDES, N.; et al. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root end filling material. **Int Endod**, v.36, n.1, p.44-8, Jan. 2003.

EDWARDS, J.C.; SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J Pathol**, v.134, n.2, p. 147-56, Jun. 1981.

EIDELMAN, E.; HOLAN, G.; FUKS AB. Mineral trioxide aggregate vs. formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. **Pediatr Dent**, v.23, n.1, p.15-8, Jan-Fev. 2001.

EMINGIL, G. et al. Levels of leukotriene B₄ in gingival crevicular fluid and gingival tissue in specific periodontal diseases. **J Periodontol**, v.72, n.8, p.1025-31, Aug. 2001.

ESTRELA, C. et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **Fac Odontol Bauru**, v.2, n.4, p.31-8, Out/Dez. 1994.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. **Braz Dent J**, v.11, n.1, p.3-9, 2000.

FACCIOLI, L.H. et al. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v.3, n.3-4, p.344-9, 1990.

FARACO JÚNIOR, I.M.; HOLLAND, R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dent Traumatol**, v.17, n.4, p.163-6, 2001.

FELS, A.O. et al. Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄. **Proc Natl Acad Sci**, v.29, p.7866, 1982.

FISCHER, E.J.; ARENS, D.E.; MILLER, C.H. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material and Super EBA as a root-end filling material. **J Endod**, v.24, n.3, p.176-9, Mar. 1998.

FORD, T.R. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **J Am Dent Assoc**, v.127, n.10, p.1491-4, Oct. 1996.

FORD-HUTCHINSON, A.W. et al. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v.286, n.5770, p.264-5, Jul. 1980.

GARLET, G.P. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 738-47.2005.

GAUDREAULT, E.; STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Involvement of leukotriene B₄ receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.75, n.1-4, p.25-34, Jan. 2005.

GERRITSEN, M.E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. **Cardiovasc Res**, v.32, n.4, p.720-32, Oct. 1996.

GILROY, D.W.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, DA. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. **Inflamm Res**, v.47, n.2, p.79-85, Feb. 1998.

GOUWY, M. et al. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine & Growth Factor**, v.16, p.561-80, 2005.

GUEDES PINTO, A. C. Tratamento endodôntico em dentes decíduos. In: Guedes Pinto, A. C. **Odontopediatria**. São Paulo:Santos, 2003. p.553-73.

HAWKEY, C.J. Cox-2 inhibitors. **Lancet**, v. 353, p.307-14, 1999.

HENRIQUES, M.G.M.O. et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res**, v.20, p. 243-9. 1992.

HERNANDEZ, E.P. et al. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. **Int Endod J**, v.38, n.2, p.137-43, Feb. 2005.

HOLAN, G.; EIDELMAN, E.; FUKS, A. B. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. **Pediatr Dent**, v.27, n.2, p.129-36, Mar-Apr. 2005.

HOLLAND R. et al. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. **J Endod**, v.25, n.11, p.728-30, Nov.1999(a).

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J Endod**, v.25, n.3, p.161-6, 1999(b).

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Braz Dent J**, v.12, n.1, p.3-8, 2001(a).

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. **Braz Dent J**, v.13, n.1, p.23-6, 2002.

HOLLAND, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. **Braz Dent J**, v.12, n.2, p.109-13, 2001(b).

HOLLAND, R. et al. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. **J Endod**, v.27, n.4, p.281-4, Apr. 2001(c).

HUANG, T.H. et al. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). **Biomaterials**, v.24, n.22, p.3909-13, Oct. 2003.

HUANG T.H. et al. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.73, n.1, p.123-8, Apr. 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. London, 1994.

KABASHIMA, H. et al. Involvement of substance P, mast cells, TNF-alpha and ICAM-1 in the infiltration of inflammatory cells in human periapical granulomas. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.3, p.175-80, Mar. 2002.

KEISER, K.; JOHNSON, C.C.; TRIPTON, D.A. Citotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. **J Endod**, v.26, n.5, p.288-91, May. 2000.

KOH, E.T. et al. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v.24, n.8, p.543-7, Aug.1998.

KOH, E.T. et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J Biomed Mater Res**, v.37, n.3, p.432-439, Dec. 1997.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. **Immunobiology**, v.211, n.3, p.137-48, Feb. 2006.

KOPYDLOWSKI, K.M. et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lip polysaccharide *in vitro* and *in vivo*. **J Immunol**, v.163, n.3, p.1537-44, Aug. 1999.

KWAK, K.I.; PARK, D.S.; OH, T.S. The effect of obturation timing and thickness of mineral aggregate matrix on sealing ability. **J Endod**, v.26, n.9, p.557, 2000.

LAM, B.K.; YANG, C.H.; WONG, P. Phospholipase A2 as leukotriene B4 for human polymorph nuclear leukocytes. In: Young, P.Y.K. **Phospholipase A2**. New York: Plenum Press, 1990. p.183-91.

LANDS, W.E. Actions of anti-inflammatory drugs. **Trends Pharmacol Sci**, v.2, p.78-80, 1981.

LANDS, W.E.M. Mechanisms of action of antiinflammatory drugs. **Adv Drug Research**, v.14, p.147-63, 1985.

LARSEN, G.L., HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v.1, p.335-59, 1983.

LEE, S.J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J Endod**, v.19, n.11, p.541-544, 1993.

LI, W.M., et al. Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. **Cytokine**, v.12, n.7, p.1017-23, Jul. 2000.

LIPOWSKY, H.H. Leukocyte margination and deformation in postcapillary venules. In: GRANGER, D.N, SCHMIDT-SCHONBEIN, G.W. **Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion**. New York: Oxford University Press, 1996, p. 130-47.

MADDOX, J.F. et al. Lipoxin B₄ regulates human monocyte/neutrophil adherence and motility: design of stable lipoxin B₄ analogs with increased biologic activity. **FASEB J**, v.12, n.6, p.487-94, Apr. 1998.

MALAVIYA, R. et al. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . **Nature**, v.381, p.77-80, 1996.

MANCUSO, P. et al. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, v.66, n.11, p.5140-6, Nov. 1998.

MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars. **Am J Dent**, v.19, n.2, p.75-9, Apr. 2006.

MARTINS, D.A.P.A.S. **Efeitos do paracetamol na permeabilidade capilar e migração leucocitária. Estudo experimental em camundongos**.1989. 77f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1989.

MASHIMA, K.; MIZUGUCHI, J. Changes in cell attachment by RSV transformation in rat liver epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.189, n.1, p.350-5, Nov. 1992.

MCCOLL, S.R., CLARK-LEWIS, I. Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists. **J Immunol**, v.163, n.5, p.2829-35, Sep. 1999.

MCDONALD, R.E.; AVERY, D.R. In: MCDONALD, R.E. **Odontopediatria**. Trad. Coord. Por Roberval de Almeida Cruz.. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991, p.279-98.

MEGHJI, J. Bone remodeling. **Br Dent J**, v, 172, p. 235-42, 1992.

MENCIA-HUERTA, J. M. et al. Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B₄ from mouse bone marrow-derived mast cells. **J Immunol**, v.130, p. 1885-90, 1983.

MENEZES, R.; BRAMANTE C.M.; LETRA, A.; CARVALHO, V.G.; GARCIA, R.B. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide

aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.98, n.3, p.376-9, Sep. 2004.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v.16, n.1, p.1-8, p.1-8, Feb. 2000.

MITCHELL, P.J.; et al. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. **Biomater**, v.20, n.2, p.167-173, Jan. 1999.

MONTENEGRO M.R.; FRANCO M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO M. R.; FRANCO M. **Patologia:processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 109-28.

MORETTON, T.R. et al. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. **J Biomed Mater Res**, v.52, n.3, p.528-33, 2000.

MOTTA, A.G. et al. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao MTA e ao hidróxido de cálcio. **RBO**, v 60, n 4, p 274-6, 2003.

MULLER, W.A. Leukocyte-Endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab Invest**, v.82, n.5, p. 521-33, May. 2002.

MUNCK, A. et al. Glucocorticoid receptors and actions. **Am Rev Respir Dis**, v.141, p.2-10, Feb. 1990.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v.95, n.10, p.3032-43, May. 2000.

NAIK, S.; HEGDE, A.M. Mineral trioxide aggregate as a pulpotomy agent in primary molars: An in vivo study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v.23, n.1, p.13-6, Mar. 2005.

NAKAYAMA, A. et al. Behavior of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. **Int Endod J**, v.38, n.4, p.203-10, Apr. 2005.

NERY, R.S. **Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes decíduos de cães após a biopulpectomia e obturação dos canais radiculares**

com Sealapex, Sealer Plus e MTA. 2000. 31f. Tese (doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.

OKAMOTO, T. **Estudo histoquímico da reatividade do tecido conjuntivo alveolar após extrações dentais.** Araçatuba, 1964. 53 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1964.

OLIVEIRA, S.H.P. et al. Role of resident peritoneal cells in eosinophil migration induced by saline. **Inte Arch Allergy Immunol**, v. 104, n.4, p. 323-31, 1994.

OLIVEIRA, S.H.P. et al. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB₄, TNF- α , IL-8 and PAF. **Inflamm Res**, v. 51, p. 144-53, 2002.

OSÓRIO, R.M. Citotoxicity of endodontic materials. **J Endod**, v.24, n.2, p.91-6, Feb, 1998.

O'SULLIVAN, S.M.; HARTWELL, G.R. Obturation of a retained primary mandibular second molar using mineral trioxide aggregate: a case report. **J Endod**, v.27, n.11, p.703-5, Nov. 2001.

PARENTE, L. et al. Inhibition of eicosanoid formation and lipocortin induction by glucocorticoid in human cells lines and in patients with inflammatory lung diseases. **Pharmacology Research**, v.26, p. 44-5, 1992.

PASCUTTI, M.F. et al. Benznidazole, a drug used in Chaga's disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. **Life Science**, v.76, n.6, p.685-97.2004.

PELLICCIONI, G.A. et al. Evaluation of osteoblast-like cell response to ProRoot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. **J Mater Sci Mater Med**, v.15, n.2, p.167-73, Feb. 2004.

PEREZ, A. L. et al. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. **Int Endod J**, v.36, n.8, p.564-70, Aug. 2003.

PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. **J Immunol**, v.150, n.3, p. 992-9, Feb.1993.

PERRETTI, M.; HARRIS, J.G.; FLOWER, R.J. A role for endogenous histamine in interleukin-8-induced neutrophil infiltration into mouse air-pouch: investigation of the modulatory action of systemic and local dexamethasone. **Br J Pharmacol**, v.112, n.3, p. 801-8, Jul.1994.

PISTORIUS, A.; WILLERSHAUSEN, B.; BRISENO MARROQUIN, B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. **Int Endod J**, v.36, n.9, p.610-5, Sep. 2003.

PITT FORD, T.R. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **J Am Dent Assoc**, v.127, n.10, p.1491-4, 1996.

RAMOS, C.D. et al.. Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. **Cytokine**, v.21, n.5, p.214-23, Mar. 2003.

RAUD, J. et al. Prostaglandin modulation of mast cell-dependent inflammation. **Agents Actions**, v.26, n.1-2, p.42-4, Jan. 1989.

RE, F. et al. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. **J Cell Biol**, v.127, n.2, p.537-46, Oct. 1994.

RIBEIRO, R.A. et al. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v.73, n.4, p.472-7, Aug. 1991.

RIBEIRO, R.A. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol**, v.112, n.1, p.27-35, Jan. 1997.

RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int J Exp Pathol**, v.71, n.5, p.717-25, Oct. 1990.

RIBEIRO, R.A.; CORRÊA, M.S.N.; COSTA, L.R.R.S. Tratamento pulpar de dentes decíduos. In: CORRÊA, M.S. **Odontopediatria na primeira infância**. São Paulo: Santos, 2001, p. 473-496.

RIOS-SANTOS, F. et al. A critical role of leukotriene B₄ in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v.19, n.1, p.61-5, Jan. 2003.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR V. Inflamação e Reparo. **Patologia Estrutural e Funcional**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1991.1231p.

ROCHA, M.F. et al. Clostridium difficile toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. **Infect Immun**, v.65, n.7, p.2740-6, Jul. 1997.

ROT A., VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptative host defense: basic chemokinese grammar for imune cells. **Annu Rev Immunol**, v.2, p.891-928, 2004.

SAIDON, J.; SAFAVI, K.; SPANGBERG, L.S. Tissue reaction to implanted mineral trioxide aggregate or portland cement. **J Endod**, v.28, n.3, p.247, Mar. 2002.

SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in molar. **Dent Traumatol**, v.19, p.314-20, 2003.

SAMUELSSON, B. et al. Leukotriene Biosynthesis. Advances in the Understanding and treatment of asthma. **Ann NY Acad Sci.**, New York, v.629, Cap.III, p.89. Edited by Priscilla J. Piper and Robert D. Krell, 1991.

SANTOS, S.F. et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J Appl Oral Sci**, v.12, n.11, p.1-11, Jan./Mar. 2004.

SASAKI, T. et al. Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. **J Dent Res**, v.69, n.1, p.67-74, Jan. 1990.

SAUTEBIN, L. et al. Lipocortin and vasocortin: two species of anti-inflammatory proteins mimicking the effects of glucocorticoids. **Pharmacol. Res**, v.25, p.1-12, 1992.

SCHEERER, S.Q.; STEIMAN, H.R.; COHEN, J.A. Comparative evaluation of three root-end filling materials: an *in vitro* leakage study using *Prevotella nigrescens*. **J Endod**, v.27, n.1, p.40-2, Jan. 2001.

SCHEINMAN, R.I. et al. Role of transcriptional activation of IκBα in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, p. 283-286, 1995.

SCHRAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflamm Res**, v.53, n.12, p.644-52, Dec. 2004.

SCHWARTZ, R.S. et al. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. **J Am Dent Assoc**, v.130, p. 967-75, 1999.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v.18, n.3-4, p.439-46, Jun. 1986.

SERHAN, C.N.; HAEGGSTROM, J.Z.; LESLIE, C.C. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. **FASEB J**, v.10, n.10, p.1147-58, Aug. 1996.

SHABAHANG, S. et al. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. **J Endod**, v.25, n.1, p.1-5, Jan. 1999.

SILVA, T.A., et al. Dentin sialoprotein and phosphoprotein induce neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1 β , TNF- β , and CXC chemokines. **Calcif Tissue Int**, v.74, n.6, p.532-41, Jun. 2004.

SILVA, T.A., et al. Macrophages and mast cells control the neutrophil migration induced by dentin proteins. **J Dent Res**, v.84, n.1, p.79-83, 2005.

SIQUEIRA JR, J.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238p.

SOARES, I.M. **Resposta pulpar ao MTA - agregado de Trióxido Mineral comparada ao hidróxido de cálcio, em pulpotomias. Histológico em dentes de cães**. 1996. 74 f. Tese (Doutorado em endodontia) - Faculdade de Odontologia de Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte circulation and leukocyte migration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, p.301-14, 1994.

STANLEY, H.R. Toxicity testing of dental materials. Boca Raton, FL, CRC Press, 1985.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v.6, n.3, p.89-96, Jun. 1990.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, p.498-521, 1998.

TAKAHASHI, H. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular diseases. **Int Endod J**, v.31, n.5, p.311-25, Sep. 1998.

TANG H.M. et al. Endotoxin leakage of four root-end filling materials. **J Endod**, v.23, n.4, 259, 1997.

TANG, H.M.; TORABINEJAD, M.; KETERRING, J.D. Leakage evaluation of root-end filling materials using endotoxin. **J Endod**, v.28, n. 1, p., 5-7, Jan. 2002.

TATAKIS, D.N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J Periodontol**, v.64, 5 Suppl, p.416-31, May. 1993.

TEIXEIRA, M.M. et al. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. **J Clin Invest**, v.100, n.7, p.1657-66, Oct.1997.

TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor, ZM 230487, on cutaneous allergic inflammation in the guinea-pig. **Br J Pharmacol**, v.11, n.4, p.1205-11, Apr. 1994.

TESSIER, P.A. et al. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF-alpha. **J Immunol**, v.161, n.3, p.1204-11, Aug.1998.

TITTLE, K.W. et al. Apical closure induction using bone growth factors and mineral trioxide aggregate (abstract). **J. Endod**, v.22, p.198, 1996.

TOLEDO, O.A. Terapia endodôntica de decíduos. In: TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. Editora Premier, 2 edição, 1996, p. 223-37.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T.F.; PITT FORD, T.R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root-end filling material. **J Endod**, v.19, n.12, p.591-595, 1993.

TORABINEJAD, M; MACDONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v. 21, p. 249-53, 1995(a).

TORABINEJAD, M; et al. Tissue reaction to implanted super EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. **J Endod**, v.21, n.11, p. 569-71, 1995(b).

TORABINEJAD, M. et al. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. **J Endod**, v.21, n.12, p.603-8, Dec. 1995(c).

TORABINEJAD, M. et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **J Endod**, v.23, n.4, p.225-8, 1997.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v.25, n.3, p.197-205, Mar. 1999.

TRIZIO, D. et al. Identification of immunotoxic effects of chemicals and assessment of their relevance to man. **Food Chem Toxicol**, v.26, n.6, p.527-39, Jun. 1988.

TROWBRIDGE, H.O.; EMLING, R.C. **Inflamação: uma revisão do processo**. Chicago: Quintessence, 1996. 174p.

TSAI, W.A. et al. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. **Infect Immun**, v.68, p. 4289-96.2000.

TZIAFAS, D. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **Int Endod J**, v.35, n.3, p.245-54, Mar. 2002.

UNANUE, E.R. The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. **Immunol Rev**, v.40, p.227-55, 1978.

WANG, C.Y.; TANI-ISHII, N.; STASHENKO, P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. **Oral Microbiol Immunol**, v.12, n.2, p.65-71, Apr. 1997.

WELDON, J.K. et al. Sealing ability of mineral trioxide aggregate and Super Eba when used as furcation repair materials: a longitudinal study. **J Endod**, v.28, n.6, p.467-70, Jun. 2002.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v.355, n.9204, p.646-8, Feb. 2000.

WOLPE, S.D. et al. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, n.2, p.612-6, Jan. 1989.

WOOD, S.C.; KARRAS, J.G.; HOLSAPPLE, M.P. Integration of the human lymphocyte into immunotoxicological investigations. **Fundam Appl Toxicol**, v.18, n.3, p.450-9, Apr. 1992.

YALTIRIK, M. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **J Endod**, v.30, n.2, p.95-9, Feb. 2004.

YOKOMIZO, T. et al. A second leukotriene B4 receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med**, v.192, n.3, p.421-32, Aug 2000.

ZHANG, X.W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **Br J Pharmacol**, v.133, n.3, p.413-21, Jun 2001.

ZHU, Q. et al. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. **J Endod**, v.26, n.7, p.404-6, 2000.

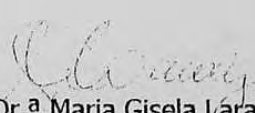
ANEXO A – Comitê de Ética

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO MTA PARA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS" sob responsabilidade de SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA E ALESSANDRA CRISITNA GOMES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 32/05.

Araçatuba, 26 de abril de 2005.


Prof.^a Ass. Dr.^a Maria Gisela Laranjeira
Presidente

ANEXO B - SOLUÇÕES

1 TAMPÃO SALINA-FOSFATO (PBS)

Cloreto de sódio P.A. (MERCK)	8,0g
Cloreto de potássio P.A. (MERCK)	0,2g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (MERCK)	1,15g
Fosfato de potássio monobásico P.A. (MERCK)	0,2g
Água deionizada Mili-Q q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada antes de ser utilizada.

2 LÍQUIDO DE TURK

Ácido Acético Glacial P.A. (MERCK)	20 mL
Azul de metileno (MERCK)	0,5g
Água deionizada Mili-Q q.s.p	1 L

3 SOLUÇÃO DE TRIS (0,1 M)

Tris (Sigma)	6,1 g
Água deionizada Mili-Q q.s.p	500 mL

O pH foi ajustado para 8.

4 MEIO DE CULTURA RPMI 1640

RPMI 1640 (Sigma)-----10.4 g

Bicarbonato de sódio P.A. (Merck)-----2,2 g

Água deionizada Mili-Q q.s.p-----1 L

O pH foi ajustado para 7,2

5 MEIO DE CULTURA RPMI 1640 COMPLETO

RPMI 1640 (Sigma)-----10.4 g

Bicarbonato de sódio P.A. (Merck)-----2,2 g

Água deionizada Mili-Q q.s.p-----1 L

Soro fetal bovino (Sigma)-----100 mL

Penicilina/Streptomicina (Sigma)-----10 mL

O pH foi ajustado para 7,2 o meio filtrado em milipore 0,22 µm e mantido a 4°C.

6 MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECO (DMEM)

Bicarbonato de sódio P.A. (Merck)-----3,7 g

Água deionizada Mili-Q q.s.p-----1 L

Meio de Eagle Modificado por Dulbeco-----10 g

7 MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECO (DMEM) Completo

Bicarbonato de sódio P.A. (Merck)-----3,7 g

Água deionizada Mili-Q q.s.p-----1 L

Meio de Eagle Modificado por Dulbeco-----10 g

Soro fetal bovino (Sigma)-----	150 mL
Penicilina/Streptomicina (Sigma)-----	10 mL
Gentamicina-----	1 mL
Fungizone-----	0,3 mL
Glutamina-----	20 mL

O pH foi ajustado para 7,2 o meio filtrado em milipore 0,22 µm e mantido a 4°C.

8 MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECO (DMEM) Completo para Mastócitos

DMEM incompleto-----	800 mL
Glutamina-----	20 mL
Piruvato-----	10 mL
Aminoácido não essencial-----	10 mL
Penicilina/Streptomicina-----	10 mL
Gentamicina-----	1 mL
Fungizone-----	1,2 mL
Meio de célula T estimulado com ConA-----	0,1mL

Após filtrar a mistura acrescentar 150 mL de soro fetal bovino.

ANEXO C- Artigo enviado

Artigo enviado ao *International Endodontic Journal* em 04/09/2006

MTA- induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on LTB₄

A.C. Gomes¹; J.E. Gomes-Filho², S.H.P. Oliveira¹

Department of Basic Science¹ and ²Endodontics Department, Araçatuba Dentistry School, São Paulo State University, Araçatuba, SP, Brazil

Running Title: MTA-Induced Neutrophil Migration

Keywords: macrophages, mast cells, mineral trioxide aggregate, IL-1 β , MIP-2, LTB₄.

To whom correspondence should be addressed

Sandra Helena Penha Oliveira PhD

Department of Basic Science

School of Dentistry, Sao Paulo State University

Rua José Bonifácio, 1193 Vila Mendonça

16015-050, Araçatuba-SP, Brazil

Phone: 55 18 3636-3306

Fax: 55 18 3636-3332

e-mail: shpoliv@foa.unesp.br

ABSTRACT

Aim to investigate the participation of resident peritoneal cells (macrophages and mast cells) and the mediators involved in the neutrophil migration induced by the intraperitoneal administration of mineral trioxide aggregate (MTA) in mice.

Methodology MTA was injected into the peritoneal cavities in the doses of 0.5, 5, 50 and 100 mg and after 6, 12, 24 and 48 h the neutrophil migration was determined. MTA (50 mg/cavity) in time 6 h was chosen to the experiments. MTA (50 mg) was injected into non-treated or pre-treated mice cavities with a cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (5 mg/kg), a glucocorticoid, dexamethasone (1 mg/kg), a 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C (20 mg/kg) and an antagonist of LTB₄ receptor, U75302 (10 mg/kg) to determine the mediators involved. The macrophage population was increased by thioglycolate 3% or the mast cell population was depleted by 48/80 compound pre-treatment to investigate the role of resident peritoneal cells. The concentration of IL-1 β and MIP-2 in the peritoneal exudates was measured by ELISA.

Results MTA induced dose and time dependent neutrophil migration into mice peritoneal cavities, which was inhibited by dexamethasone, BW A4C and U75302. Indomethacin was ineffective in the migration process. IL-1 β and MIP-2 were detected in inhibits the peritoneal exudates induced by MTA administration. Increasing macrophage population enhanced neutrophil migration while depleted mast cell population reduced MTA-induced neutrophil migration.

Conclusions The results of this study suggest that MTA induces neutrophil migration via a mechanism dependent on resident mast cells and macrophages and mediated by LTB₄, IL-1 β and MIP-2.

INTRODUCTION

Dental materials have a significant importance to the orofacial system due to toxic compounds that can initiate an inflammatory response on surrounding tissues and interfere in the healing process. Several studies have showed a favourable response of the tissues to mineral trioxide aggregate with no significant inflammation. Its role on root repair and bone formation has been widely documented (Torabinejad et al. 1995a, Pitt Ford et al. 1996, Holland et al. 2001).

Since its first description in the dental literature, MTA has been used as pulp capping material (Pitt Ford et al. 1996), pulpotomy (Torabinejad et al. 1999), root-end filling material (Torabinejad et al. 1995a, Economides et al. 2003), root canal filling (Holland et al. 1999b), apexification (Shabahang et al. 1999), and root or furcal perforation treatment (Pitt Ford et al. 1995) with deposition of hard tissue. The powder of MTA contain calcium oxide that in contact with water would be converted in calcium hydroxide that in contact the tissues fluid, would be dissociated in Ca^{+2} e OH^- ions. The Ca^{+2} ions react with the carbon dioxide from tissues producing granulations of calcite and after that fibronectin. The fibronectin leads the cellular migration, adhesion and differentiation with formation of hard tissue (Holland et al. 1999a). However, the whole mechanism involved in the repair process, including the hard tissue formation is unknown due to the complexity of the process in the molecular biology understanding.

Leukocytes are the main actors in the body's defence system, which has a non-specific branch consisting of granulocytes and macrophages, mast cells and a specific lymphocyte branch. Neutrophil migration and activation during an inflammatory response result from several events. Among these, an important role has been ascribed to the release of chemoattractants by resident cells. It has been

shown that during inflammation macrophages, mast cells or lymphocytes control neutrophil influx by the release of cytokines, chemokines or LTB₄ (Ajueborn et al. 1999).

Macrophages, a defence cell from the non-specific immune system, can eat and destroy by either phagocytosis or secretion of cytotoxic compounds, like granulocytes. However, macrophages can also act more specifically by collaborating with lymphocytes and their products (Imhof & Dunnon 1997). Mast cells produce inflammatory mediators and signalling molecules. Upon activation, mast cells also produce arachidonic acid metabolites, including leukotrienes and prostaglandins (Raud 1989). Mast cells have the capacity of releasing cytokines and chemokines and coordinating leukocyte trafficking (Pawakar 2001).

The inflammatory response of different tissues to MTA has been evaluated. Nevertheless, little information is available about the events involved in the inflammatory process and responsible for cell migration to injured sites where MTA was placed. The aim of study was to investigate whether intraperitoneal administration of MTA induces neutrophil migration in mice and the role of the resident peritoneal cells and the mediators involved in the process.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures involving the use of animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Welfare Committee of the School of Dentistry of Araçatuba, Sao Paulo State University.

BALB/c mice weighing 18-20 g were used for *in vivo* experiments. The animals were housed under climate-controlled conditions and received water and food *ad libitum* until use.

Materials

The following reagents were used: MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil), dexamethasone (Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, USA), BW A4C (Wellcome Research Lab., UK), indomethacin (Sigma, St Louis, MO, USA), thioglycollate (Difco, Detroit, MI, USA), U 75302 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), 48/80 compound (Sigma, St Louis, MO, USA) and fMLP (Sigma, St Louis, MO, USA).

MTA-induced neutrophil migration into mouse peritoneal cavity

MTA suspension was injected into mouse peritoneal cavity at different dispersions (0.5; 5; 50 and 100 mg *per cavity*). These dispersions resulted from the mixing of 0.25, 2.5, 25, 250 mg of MTA in 0.5 mL distilled water. The control mice received 0.5 mL PBS. The time course was analyzed 6, 12, 24 and 48 h after MTA injection at a suspension of 50 mg/cavity.

Collection of exudate

The animals were anesthetized and killed by cervical dislocation and peritoneal cells were harvested by injecting 4 mL PBS containing 5 U heparin/mL intraperitoneally (i.p.). The global cells were counted from the exudates collected using Neubauer camera and optic microscope (40X). For the differential count, the exudates were centrifuged, the supernatants discarded, the cells resuspended in

300 μ L of 0,3% BSA and stained by the Diff Quick to be performed with optic microscope (100 X) and oil immersion (Souza & Ferreira 1985).

Effect of Indomethacin, Dexamethasone, BWA4C and U75302 on neutrophil migration induced by intraperitoneal administration of MTA

Neutrophil migration into mouse peritoneal cavity induced by MTA was evaluated in non-treated and treated animals with the following drugs: a cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (5 mg/kg, subcutaneous (s.c.)); a glucocorticoid, dexamethasone (0.5 mg/kg, s.c.), a 5-lipoxygenase inhibitor, BWA4C (50 mg/Kg, s.c.) and an antagonist of LTB₄ receptor, U75302 (0.5 mg/kg, s.c.). The drugs were injected 30 min prior to MTA injection, except for dexamethasone, which was injected 1 h before MTA injection. Neutrophil migration was evaluated 6 h after the injection of the stimuli

Determination of production of IL1- β and MIP-2 in mouse peritoneal cavity stimulated by MTA

The concentrations of IL- β and MIP-2 in the peritoneal exudates stimulated with MTA were measured by ELISA. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4°C with an immunoaffinity-purified polyclonal sheep antibody against IL- β (2 μ g/ mL) and MIP-2 (2 μ g/ mL) (R&D Systems, USA). After blocking the plates, recombinant murine IL- β and MIP-2 standards (R&D Systems, USA) at various dilutions, together with the samples, were added in duplicate at room temperature for 2 h. Rabbit biotinylated immunoaffinity-purified polyclonal anti- IL- β and MIP-2 antibody (R&D Systems, USA) at 1:1000 dilution was added, followed by incubation at room temperature for 1 h. Finally, 100 μ L of avidin-HRP (1:5000 dilution: DAKO A/S.

Denmark) was added to each well; after 30 min the plates were washed and the colour reagent OPD (Sigma, USA)(40 µg well) was added. After 15 min, the reaction was interrupted with 1 M H₂SO₄ and the O.D. was measured at 490 nm. The results were expressed as pg, based on standard curve.

Increasing of the peritoneal macrophage population by pretreatment with Thioglycolate (Tg)

The increase in peritoneal macrophages numbers was obtained by i.p. injection of 1 mL Tg (3% w/v) 4 days before the stimuli injection. Neutrophil migration was assessed 6 hrs after i.p. injection of MTA (50 mg/cavity), fMLP (100 nmol/ cavity), or PBS(control).

Depletion of peritoneal mast cell population by subchronic pretreatment with 48/80 (48/80 compound)

The method used was described in a previous study (Di Rosa et al. 1971). The animals were pretreated with 48/80 compound for 4 days (0.6 mg/kg, i.p. twice a day for 3 days and 1.2 mg/kg, i.p. twice a day on the 4th day). On the 5th day, the depletion of mast cell population in a selected group of animals was assessed by conventional light microscopy after staining with the Diff Quick staining method. Mast cell counting in the 48/80 compound -treated mice was compared to mast cell counting in the non-treated control animals. MTA (50mg/mouse), fMLP (100 nmol/cavity) was then injected into the mice and control received PBS. MTA-induced neutrophil migration was evaluated 6 h later as described earlier.

MTA-induced neutrophil migration into mice 6-day-old air pouch cavity

Mice skin 6-day-old air pouches were produced as described by Edwards, 1981. The backs of the mice were shaved and 5 mL of sterile air were injected subcutaneously. Three days later, 4 mL of sterile air were again injected to maintain pouch latency. Six days after the initial injection the pouches were used. MTA suspension (50 mg/cavity) or PBS (control) was injected into the 6-day-old air pouches. Neutrophil migration was evaluated 6 h after MTA injection. The 6 day-old air pouch was used to confirm the involvement of mast cells in the recruitment of neutrophils, since these cavities do not have resident mast cells, but a small population of macrophages, fibroblasts and microcirculation (Edwards, 1981).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SEM. The number of animals *per* group was 5-6. Data were analyzed statistically by analysis of variance and Bonferroni correction. Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

MTA i.p. injection induced a dose-dependent neutrophil migration into mice peritoneal cavities. This recruitment was significant with the doses of 5, 50 and 100 mg of MTA *per* cavity compared to the control (PBS) (Fig. 1a). Neutrophil migration was evaluated 6 h after MTA injection. Mononuclear cell accumulation in the doses of 0.5, 5, 50 and 100 mg/mL was not observed in its time point (Fig. 1b). Regarding the time-course, MTA-induced neutrophil migration (50 mg/cavity) peaked 6 h after the stimulus decreasing 48 h after the injection in comparison to the control group (Fig. 1c). Mononuclear recruitment was only observed 48 h after the stimulus (Fig. 1d). The following experiments designed to investigate the mechanisms underlying

neutrophil migration were conducted using MTA in the dose of 50 mg/cavity 6 h after the injection.

While investigating the mediators involved in MTA-induced neutrophil migration, the effect of anti-inflammatory drugs was evaluated. The animals were pretreated with a cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (5 mg/kg), but no effect was observed on neutrophil migration. Pretreatment animals with a glucocorticoid, dexamethasone (0.5 mg/kg), a 5-lipoxygenase inhibitor, BWA4C (50 mg/kg) and an antagonist of LTB₄ receptor, U75302 (0.5 mg/Kg) was able to inhibit neutrophil migration induced by MTA (Fig. 2). These results suggest that cyclooxygenase products are not involved in MTA-induced neutrophil migration into the peritoneal cavities of mice. Moreover, the MTA-neutrophil accumulation was mediated by the release of lipoxygenase products.

The MTA-stimulated exudate of peritoneal cavities was used to determine which cytokines and/or chemokines are involved in inflammatory process into mice peritoneal cavities. The production of IL-1 β and MIP-2 in the groups stimulated with MTA was significantly higher when compared to the control group (Table 1).

To investigate whether macrophages or mast cells are responsible for releasing of neutrophil chemotactic factors during inflammatory response induced in MTA-stimulated mouse peritoneal cavities we pre-treated the animals with Thioglycollate and 48/80 compound. The augmentation of macrophage numbers (Fig 3a) led to a considerable increase in MTA-induced neutrophil migration (Fig. 3b). Depletion of the peritoneal mast cell population by chronic pretreatment of mice with 48/80 compound reduced mice intraperitoneal mast cell population (Fig. 3c), which, in turn, decreased the MTA-induced neutrophil migration into the peritoneal cavity (Fig 3d). Confirming that mast cells are involved on the release of neutrophilotactic factor, we observed

that administration of MTA into 6-day-old air pouch cavities of mice, that do not have mast cells induced a slight neutrophil migration. This recruitment may be due to the presence of macrophages since the MTA induces neutrophil migration is dependent of macrophages and mast cells. (Fig. 3e). The administration of Tg or 48/80 compound did not affect the responsiveness of the peritoneal cavities to fMLP.

DISCUSSION

Several studies have showed a favourable response of the tissues to mineral trioxide aggregate with no significant inflammation in many *in vivo* models of study; its role on root repair and bone formation (Torabinejad et al. 1995b, Pitt Ford et al. 1996, Holland et al. 2001); as pulp capping material (Pitt Ford et al. 1996), in pulpotomy (Torabinejad et al. 1999); as root-end filling material (Torabinejad et al. 1995a, Economides et al. 2003); as root canal filling (Holland et al. 1999b); and in apexification (Shabahang 1999).

In this study, MTA was investigated it was related to its ability of attracting inflammatory cells into the peritoneal cavity, as a model of acute inflammation. The model of acute peritonitis was chosen to address the pathways involved in MTA-induced neutrophil chemotaxis because of the simplicity in quantifying cell recruitment and in performing pharmacological and immune manipulation (Silva et al 2004).

The results of the present study indicated that MTA-induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of mice in a time and dose-dependent manner. This neutrophil migration induced by MTA (50 mg/cavity) peaked 6 h after injection of the stimulus decreasing 48 h post-injection. In agreement with our study, it was observed that neutrophil migration induced by dentin had a same pattern response it means

that it peaked 6 hours decreasing 48 h after the stimulus (Silva et al. 2004). The chemical nature of the MTA which provokes the neutrophil migration requires further study.

The inflammatory process is divided into three phases: alterative, exudate and proliferate (Montenegro & Fecchio, 1999). The initial inflammatory process must be important to release inflammatory mediators and activate other cells demanded for the healing process, once the observation of the tissue response to MTA in later period of time showed a tissue reaction with no inflammatory cells and hard tissue formation (Torabinejad et al. 1995b, Pitt Ford et al. 1996, Holland et al. 2001, Torabinejad et al. 1999, Economides et al. 2003, Holland et al. 1999a, Shabahang et al. 1999).

In the present study, the mechanism by which MTA induced the neutrophil recruitment was evaluated. Dexamethasone, a glucocorticoid, markedly reduced neutrophil migration, suggesting the participation of cytokines and eicosanoids in this process, since this class of drugs inhibits these mediators (Munck et al. 1990, Canetti et al. 2001). The involvement of LTB_4 can be account for because pretreatment of the animals with BW A4C and U75302, which are a 5-lipoxygenase inhibitor and a leukotriene receptor antagonist, respectively, inhibited the neutrophil migration. Therefore, prostaglandins seemed not to be involved in MTA-induced neutrophil migration since indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, did not affect this migration. Taken together, these results suggest the MTA-induced leukocyte accumulation occurs predominantly via cytokine production, which seem to be mediators able to induce neutrophil migration.

Since glucocorticoids inhibited the generation of cytokines and chemokines, we investigated the participation of IL-1 β and MIP-2 in neutrophil recruitment to the site

of inflammation, once they have ability of attracting neutrophils to the site of inflammation (Tessier et al. 1998, Lee et al. 2000; Zhang et al. 2001). The results showed that the animals stimulated with MTA released IL-1 β and MIP-2 in the peritoneal exudates, which is in accordance with other studies using dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein (Silva et al. 2004, Silva et al. 2005).

Investigating the involvement of resident cells in the release of chemotactic factors for neutrophil recruitment we found that increasing macrophage population by previous administration of thioglycollate enhanced MTA-induced neutrophil migration. On the other hand, fMLP-stimulated neutrophil migration, which occurs by a mechanism independent of resident cells, was not affected (Ribeiro et al. 1997). Macrophages produce several cytokines that promote the initiation, perpetuation, directing and inhibition of the immunological response process (Metzger et al. 2000). There is some evidence that macrophages are important sources of inflammatory mediators in periapical resorption sites and during physiological root resorption (Sasaki et al. 1990).

Evaluating the importance of the resident mast cells on MTA-induced neutrophil migration, it was observed that mast cell peritoneal depletion by treatment with 48/80 compound (Di Rosa 1971) decreased the number of neutrophils recruited upon MTA induction. Corroborating this result, it was observed that MTA injection into 6-day-old air pouch cavities of mice, which do not have resident mast cells, but a small population of macrophages, fibroblasts and microcirculation (Sedgwick 1986), induced a slight neutrophil migration. The fMLP-stimulated neutrophil migration, which occurs by a mechanism independent of mast cells, was not affected (Ribeiro et al. 1997).

Although we have focused our attention on chemotactic activity for neutrophils, it is important to note that MTA may have additional biological activities involved in the repair process that can be research in the further.

In summary, this study demonstrates that MTA induce leukocyte chemotaxis via the release of inflammatory mediators. It is plausible that the interaction between MTA and inflammatory cells may function as an additional source LTB₄ and cytokines in the first time of the inflammatory response. Furthermore, taken together these results may be important to improve the knowledge for further studies relating to the healing process after MTA use.

REFERENCES

Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C, Perreti M (1999). Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *Journal of Immunology* **162**, 168-91..

Canneti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ (2001). Tumor necrosis factor- α and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *British Journal of Pharmacology* **134**, 1619-28.

Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology* **104**, 15-29.

Economides N, Pantelidou, O, Kokkas, A, Tziafas, D (2003). Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root end filling material. *International Endodontics Journal* **36**, 44-8.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Junior E (2001). Mineral trioxide aggregate repair of lateral roots perforations. *Journal of Endodontics* **27**, 281-4.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Junior E (1999a). Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* **25**, 161-166

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Junior E (1999b). Reaction of dog's teeth to root canal filling mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *Journal of Endodontics* **25**, 728-30.

Imhof B.A., Dunnon D (1997). Basic mechanism of leukocyte migration. *Hormone and Metabolic Research* **29**, 614-21.

Lee SL, Monsef M, Torabinejad M (1993). Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics* **19**, 541-4.

Metzger Z (2000). Macrophages in periapical lesions. *Endodontics and Dental Traumatology* **16**, 1-8.

Montenegro MR, Fecchio D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: Montenegro MR, Franco M. Patologia: processos gerais p. 109-128. ed Atheneu, 1999.

Munk A, Mendel DB, Smith LI, Orti E (1990). Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Respir Dis* **141**, 2-10.

Pawankar R (2001). Mast cells as orchestrators of the allergic reaction the IgE-IgE receptor mast cell network. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **1**, 3-6.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP (1996). Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 127, 1491-4.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP (1995). Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;79, 756-63.

Raud J. Intravital microscopic studies on acute mast cell-dependent inflammation (1989). *Acta Physiologia Scandinavica Supplementum* **578**, 1-58.

Ribeiro RA, Souza-Filho MVP, Souza MHLP, Oliveira SHP, Costa CHS, Cunha FQ, Ferreira SH (1997). Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *International Archives of Allergy and Immunology* **112**, 37-35.

Sasaki T, shimizu T, watanabe C, Hiyoshi Y (1990). Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. *Journal Dental Research* **69**, 67-74.

Sedgwick AD, Less P (1986). A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions* **18**, 440-46.

Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P (1999). A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endodontics* **25**, 1-5.

Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin Sialoprotein induce neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1 β , TNF- α , and CXC chemokines (2004). *Calcified Tissue International* **74**, 532-41.

Silva TA, Lara VS, Silva JS, Oliveira SHP, Butler WT, Cunha FQ (2005). Macrophages and mast cells control the neutrophil migration induced by dentin protein. *J Dent Res*, 84, 79-83.

Souza GEP, Ferreira SH (1985). Blockage by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Actions* **17**, 97-103.

Tessier PA, Naccache PH, Diener RP, Gladue RP, Neote KS, Clark-Lewis I, McColl SR (1998). Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF- α . *Journal of Immunology* **161**, 1204.

Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR (1995a). Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *Journal of Endodontics* **21**, 603-8.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kariyawasan SP (1995b). Tissue reaction to implanted Super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *Journal of Endodontics* **21**, 569-71.

Torabinejad M, Chivian N (1999). Clinical applications of Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* **25**, 197-205.

Torabinejad M et al,(1997). Histological assessment of mineral trioxide aggregate as root-end filling in monkeys. *Journal of Endodontics* **23**, 225-28.

Zhang XW, Wang Y, Liu Q, Thorlacius H (2001). Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumour necrosis factor- α -induced extravasation of neutrophils in vivo. *European Journal of Pharmacology* **427**, 277-283.

FIGURE 1

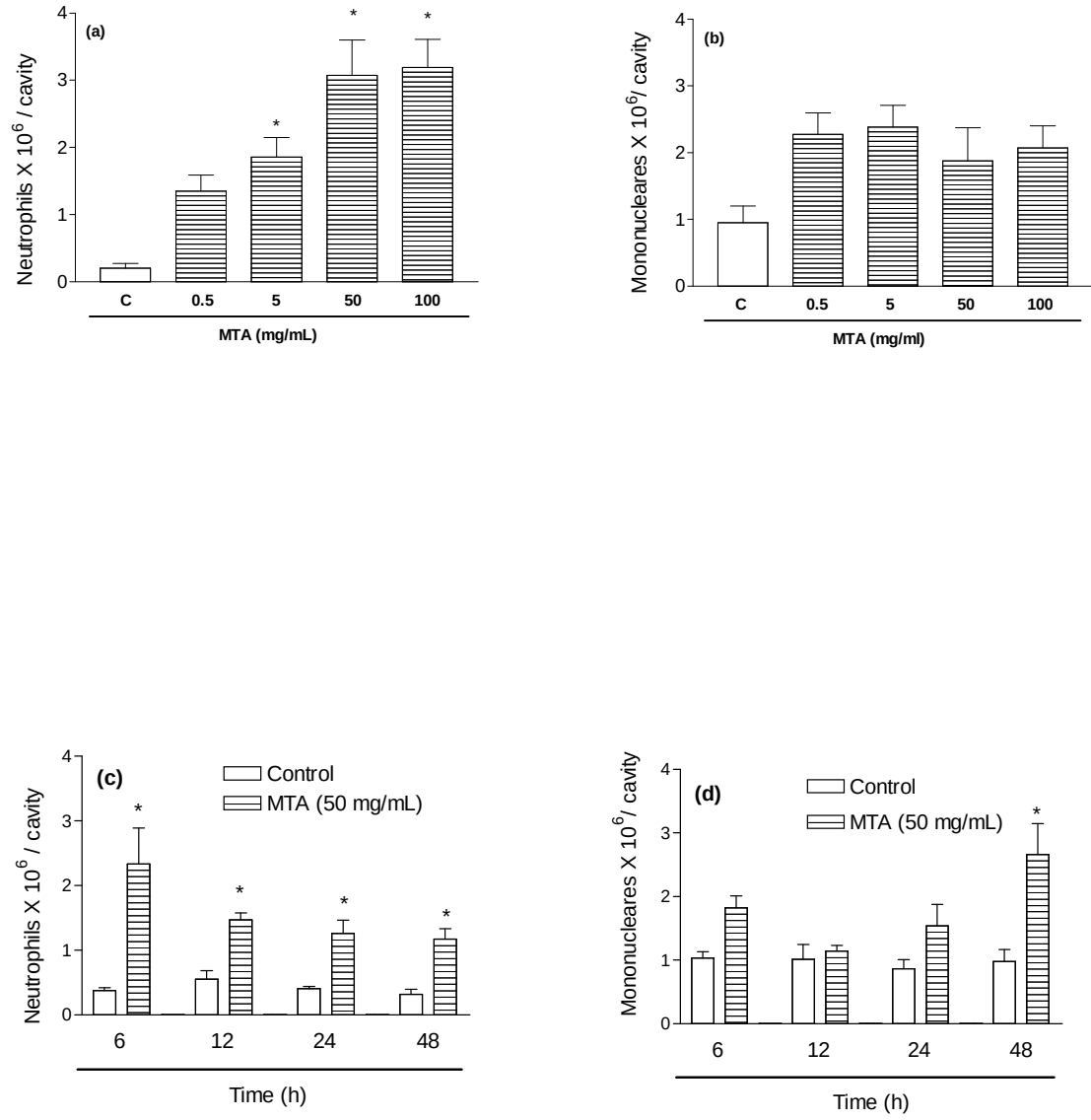


FIGURE 2

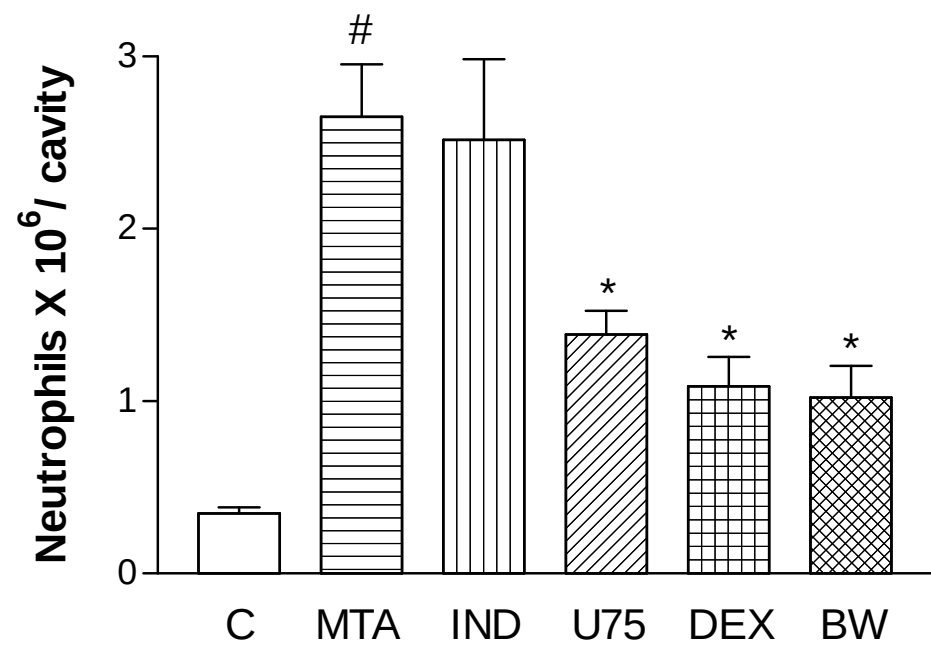


FIGURE 3

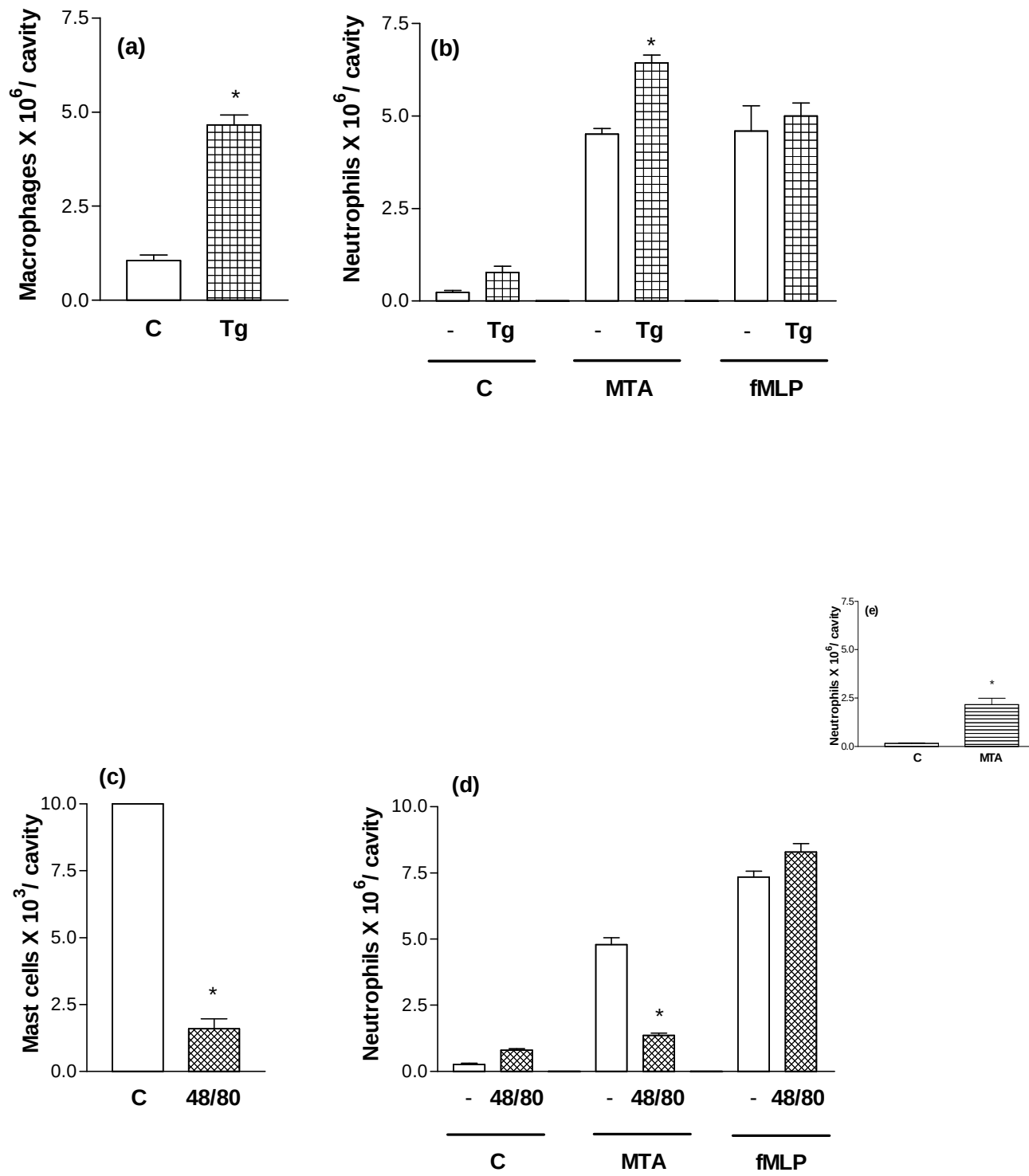


TABLE 1: Concentration of MIP-2 and IL-1 β in MTA-stimulated peritoneal exudate

Experimental group	MIP-2 pg/mL	IL-1 β pg/mL
C (control)	1.2 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.9
MTA	19.6 $\pm$ 0.2*	186.1 $\pm$ 12.3*

The results represent the means $\pm$ SEM of triplicate samples from typical experiments. The asterisk indicates significant difference between the MTA and control groups ($p < 0.05$), ANOVA with Bonferroni correction.

Legends

Fig 1. Dose response and time course of neutrophil migration **(a,c)** and mononuclear migration **(b,d)** induced by MTA to mice peritoneal cavities. Concentrations of MTA used to induce neutrophil migration were 0.5, 5, 50 and 100 mg/cavity **(a and b)**. The results are the means $\pm$ SEM and the number of animals *per* group was 6. The migration of neutrophils **(c)** and mononuclear cells **(d)** was evaluated 6, 12, 24 and 48 h after injection. The asterisk indicates a significant difference between the MTA group and control (C) ($p < 0.05$, ANOVA with Bonferroni correction).

Fig 2. Antiinflammatory drugs inhibit *in vivo* neutrophil migration induced by MTA into the mouse peritoneal cavity. The bars represent neutrophil migration in mice pretreated with indomethacin, U75302, dexamethasone and BW A4C. Neutrophil migration was evaluated 6 h after MTA injection into mice peritoneal cavities. The results are means $\pm$ SEM and the number of animals *per* group was 6. The asterisk indicates significant difference between the MTA and pretreated groups ($p < 0.05$, ANOVA with Bonferroni correction).

Fig 3. Pretreatment with thioglycollate increased neutrophil migration in mouse peritoneal cavities in response to MTA. Chronic treatment with 48/80 compound reduces the neutrophil migration induced by MTA into mice peritoneal cavities. Panel **(a)** shows the macrophage populations in control (PBS) and Tg-pretreated groups. Panel **(b)** shows neutrophil migration induced by MTA and fMLP in control (C) and Tg-pretreated cavities. Panel **(d)** shows neutrophil migration induced by MTA and fMLP in control (C) and 48/80-pretreated cavities. Neutrophil migration was evaluated 6 h after MTA and fMLP injection. Panel **(e)** shows neutrophil migration into 6-day-old air pouch cavities of mice. The results are means $\pm$ SEM and the number of animals *per* group was 6. The asterisk indicates significant difference between the MTA and pretreated groups (* $p < 0.05$, # $p < 0.001$, ANOVA with Bonferroni correction).