

SAMIRA ESTEVES AFONSO CAMARGO

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE MATERIAIS
ENDODÔNTICOS UTILIZANDO DUAS LINHAGENS CELULARES.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal

SAMIRA ESTEVES AFONSO CAMARGO

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE MATERIAIS
ENDODÔNTICOS UTILIZANDO DUAS LINHAGENS CELULARES.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal

Orientador: Prof. Adj. Sigmar de Mello Rode

São José dos Campos
2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2006.

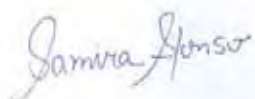
Camargo, Samira Esteves Afonso
Avaliação do comportamento biológico de materiais endodônticos utilizando duas linhagens celulares. / Samira Esteves Afonso Camargo; orientador Sigmar de Mello Rode._ São José dos Campos 2008.
126 p. ; IL.
Tese (Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.
1. Citotoxicidade – 2. Genotoxicidade – 3. Materiais endodônticos

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 09/06/2008

Assinatura:



E-mail:samiraafonso@uol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camargo SEA. Avaliação do comportamento biológico de materiais endodônticos utilizando duas linhagens celulares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

São José dos Campos, 09 de junho de 2008.

Banca examinadora

1. Prof. Adj. Sigmar de Mello Rode
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
2. Prof^a. Dr. Cristiane Miranda França
Faculdade de Odontologia
Universidade Ibirapuera - Unib
3. Prof. Assoc. Fábio Daumas Nunes
Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo - USP
4. Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
5. Prof^a. Adj. Marcia Carneiro Valera
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA

À Deus

Nesta longa caminhada a tua mão me sustentou e a tua voz me orientou em todos os momentos. Obrigada, Senhor por tuas promessas e por tudo que tens feito em minha vida.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor
determina os seus passos”

Provérbios 16:9

“Dêem graças ao Senhor porque Ele é bom; o seu amor dura para
sempre” Salmo 118:1

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu amado Ique

Agradeço seu incentivo e sua compreensão na realização de mais este sonho em minha vida. Sonho em que compartilhamos juntos muitas novas experiências e acredito que com grande êxito porque em todos os momentos pedimos a orientação do nosso Senhor Jesus. Você é muito especial, carinhoso e possui qualidades que realmente me fazem feliz. Te amo muito.

Aos meus amados pais Sérgio e Rose

A realização deste sonho é parte daquilo que vocês começaram a fazer alguns anos atrás, sempre com muito amor e dedicação me dando oportunidades para eu conseguir chegar aqui. Para mim, vocês são exemplos de bondade, dedicação e caráter que segui com muito orgulho. Agradeço a Deus por tê-los como meus pais. Obrigada por todo o amor e por fazer de meus sonhos os seus sonhos, permitindo com que eles se tornassem realidade. Amo vocês!

Aos queridos Júlio e Carol

Muito obrigada pelas palavras de incentivo e amor durante o tempo que estive longe. É bom saber que tenho o apoio e a confiança de vocês para toda a vida. Amo vocês.

Aos queridos Seu Josué, Dona Carolina e família

Obrigada pelo amor e incentivo dedicados a mim e por me receberem tão bem dentro da família de vocês. Que o Senhor permaneça nas nossas vidas nos unindo para sempre. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Sigmar

Desde o começo me incentivou e acreditou nos meus sonhos. Na realização do meu doutorado-sanduiche esteve presente em todos os momentos sempre me ajudando. Como orientador, tornou-se também um amigo, me deixando à vontade e ao mesmo tempo se preocupando com o andamento do trabalho. Muito obrigada.

Ao professor e co-orientador Dr. Gottfried Schmalz

A realização do meu doutorado-sanduiche foi possível devido a sua aceitação e confiança de que um bom trabalho poderia ser realizado em parceria. Nunca me esquecerei desta oportunidade. Tenho em você um exemplo de um grande líder de uma equipe de pesquisa. Obrigada.

À querida amiga prof^a Marcia

Desde a iniciação científica você sempre me incentivou a seguir a área de pesquisa, e se hoje estou aqui é porque me espelhei em sua dedicação, competência, sabedoria e principalmente sua humildade. É com muito orgulho que faço parte de sua equipe de pesquisadores. Fora do âmbito profissional, você é uma amiga muito especial que me conduziu para a nova vida em Jesus. Te amo muito e que Deus continue te abençoando.

Ao professor Dr. Helmut Schweikl: Agradeço a sua dedicação para me ensinar conceitos básicos da Biologia Celular. Tenho em você um exemplo de um grande cientista. Obrigada.

Ao Dr. Anton-Karl Hiller que com muita sabedoria realizou a estatística deste trabalho e ao Alexander Eckhardt pela contribuição na área de bioquímica.

Às técnicas da Universidade de Regensburg (Claudia Bosl, Claudia Waha, Carola Bolay, Christine Petzel) pela dedicação e em especial Claudia Bosl e Carola Bolay que ensinaram com muita competência a parte experimental deste trabalho.

À prof^a. Rosilene Fernandes Rocha agradeço principalmente pelo incentivo e confiança na realização de meu doutorado-sanduíche.

Ao prof. Amorim agradeço imensamente seu apoio desde a graduação. Sempre acreditando em mim e me incentivando a seguir em busca de meus sonhos. A você, meu muito obrigada, com muito carinho.

À prof^a. Yasmin Rodarte de Carvalho agradeço pela dedicação e paciência ao ensinar e ao seu incentivo.

Aos docentes do Departamento de Biopatologia Bucal: Rosilene Fernandes Rocha, Yasmin Rodarte de Carvalho, Luiz Eduardo Blumen Rosa, Adriana Aigotti H. Brandão, Cristiane Yumi Koga Ito, Antonio Olavo Cardoso, Jorge José Benedito Oliveira Amorim pelos ensinamentos que me foram concedidos.

À aluna de iniciação científica Patrícia Rosa pelo entendimento e apoio enquanto eu estive longe.

À prof^a. Mirian da Universidade Ibirapuera por me ensinar com tanta dedicação os conceitos básicos de cultura celular e à técnica Adriana por me ajudar no laboratório.

Aos amigos da pós – graduação: Renata Prado, Thaís, Francine, Suzana, Vanessa, Andreza, Gisele, Rodrigo, Celina, Vitor, Juliana, Márcia e Cristina Werckman pela amizade construída durante o curso de Doutorado. Um agradecimento especial à Andreza que me ajudou no percurso para realização do doutorado-sanduíche.

Em especial, a amiga Renata pela amizade que criamos durante o curso de doutorado e incentivo que me deu durante a execução deste trabalho.

À querida amiga Paula Elaine pela amizade sincera, dedicação e carinho em todos os momentos de minha vida. Tenho em você um exemplo de solidariedade e bom humor. Obrigada pela sua amizade e por ter realizado a impressão deste trabalho com tanto cuidado.

Às queridas amigas Manuela e Juliana, pela amizade que temos desde a graduação e pelo incentivo na realização deste trabalho.

Ao querido amigo Fábio que mesmo distante esteve presente em muitos momentos que estivemos longe nos apoiando e incentivando.

Aos casais Gi e Léo, Marcelo e Tati, Eduardo e Ana, Domício e Tati, Renatinho e Paulinha pela grande e sincera amizade.

Aos amigos Simone e Beto agradeço pela sincera e grande amizade e pelo carinho. Vocês sempre estão presentes, acreditando e incentivando meus sonhos. Amo vocês.

Ao Emmanuel, meu irmão na fé, que com suas palavras de amor e bênção me fez conhecer verdadeiramente a vida em Jesus.

Aos amigos do grupo de oração: Bia, Marcio, Luciane, Claudio, Marcia Maciel, Simone, Helena, Vinicius, Leonardo, Isa, Seu Alberto, Dona Dirce pelas orações que me sustentaram durante este trabalho.

Aos amigos, Cláudio e Lú pela sincera amizade, carinho e preocupação enquanto estivemos longe.

À Márcia Maciel, pela sincera amizade, pelo carinho e por ser sempre muito prestativa em todos os momentos.

Aos amigos da pós-graduação da área de Endodontia: Alessandra, Elaine, Lecy, Giovana, Mariana, Lilian e Manuela pela amizade e incentivo.

Às prof^{as}. Rosilene Fernandes Rocha e Cristiane Yumi Koga Ito pela competência e dedicação ao exercer o cargo de coordenador da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

À secretária do Departamento de Biopatologia Bucal da FOSJC; Silvia que foi muito prestativa quando a solicitei em todos os momentos.

Às bibliotecárias da FOSJC: Dora, Silvana, Ana, Fátima, Neide, Renata, Sônia e Ângela de Brito Bellini.

Às secretárias da Pós – Graduação; Rosemary, Erena e Cida pelo cuidado na orientação e esclarecimentos prestados durante este curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização do doutorado-sanduiche na Alemanha e conseqüentemente este trabalho.

A todos os funcionários da FOSJC que direta ou indiretamente muito contribuíram no convívio diário.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Propriedades e indicações dos materiais endodônticos.....	22
2.2 Testes de biocompatibilidade <i>in vivo</i> de materiais endodônticos....	25
2.3 Ensaio de citotoxicidade.....	33
2.4 Teste de ROS.....	38
2.5 Ensaio de genotoxicidade.....	41
2.6 Ciclo celular.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 Preparo dos extratos originais.....	47
4.2 Teste de citotoxicidade.....	49
4.3 Mensuração dos níveis de espécie reativos de oxigênio (ROS).....	52
4.4 Teste de micronúcleo (MNT).....	55
4.5 Análise do ciclo celular.....	58
4.5.1 Citometria de fluxo.....	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 Teste de Citotoxicidade.....	62
5.2 Mensuração dos níveis de espécie reativos de oxigênio (ROS).....	66
5.3 Teste de micronúcleo (MNT).....	68
5.4 Análise do ciclo celular.....	71
6 DISCUSSÃO.....	75
6.1 Discussão da Metodologia.....	75
6.2 Discussão dos Resultados.....	83

6.2.1 Testes de biocompatibilidade <i>in vivo</i> de materiais endodônticos.	84
6.2.2 Ensaio de citotoxicidade.....	86
6.2.3 Teste de ROS.....	95
6.2.4 Ensaio de genotoxicidade.....	97
7 CONCLUSÃO.....	104
8 REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS.....	121
ABSTRACT.....	129

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	= Adenosina trifosfato
BSA	= Albumina de soro bovino
Ca (OH)₂	= Hidróxido de cálcio
DCFH	= 2,7 - diclorodihidrofluoresceína
DCF-DA	= 2,7 -diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DNA	= Ácido desoxirribonucléico
EDTA	= Ácido etileno diamino tetracético
EMS	= Etilmetano sulfanato
FACS	= Citometria de fluxo (<i>Fluorescence-actived cell sorting</i>)
HC	= Hydro C
HCl	= Ácido clorídrico
H₂O₂	= Peróxido de hidrogênio
K₂S₂O₅	= Metabissulfito de potássio
MEM	= Meio mínimo essencial
MNT	= Teste de micronúcleo
MTA	= Agregado trióxido mineral
POM	= Polímero derivado do óleo da mamona
PBS	= Solução salina tamponada com fosfato
PI	= Iodeto de propídio
ROS	= Espécies reativos de oxigênio
SBF	= Soro bovino fetal
TEGDMA	= Trielinenoglicol dimetacrilato
tHPC	= Células pulpares humanas transformadas
V79	= Células pulmonares de hamster Chinês

Camargo SEA. Avaliação do comportamento biológico de materiais endodônticos utilizando duas linhagens celulares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

Alguns materiais endodônticos são capazes de liberar componentes tóxicos que podem interagir com o tecido pulpar e/ou periapical. A proposta deste estudo foi avaliar *in vitro*, em nível molecular, os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de materiais endodônticos sobre cultura de células pulpares humanas transformadas (tHPC) e fibroblastos V79. Os espécimes de hidróxido de cálcio (HC, Hydro C, Dentsply, Brasil), MTA cinza (Angelus, Brasil), MTA branco (Angelus, Brasil) e polímero da mamona (POM, Poliquil, Brasil) foram misturados e colocados em meio de cultura (91,6 mm² superfície /ml) por 24h em 37°C. Vitrebond (3M ESPE) foi utilizado como grupo controle positivo. As tHPC foram expostas aos extratos e diluições dos materiais e após 24h, a sobrevivência celular foi determinada pelo teste de cristal violeta. A liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tHPC foram mensuradas após 1h de exposição aos materiais. ROS foram detectados pelo manchamento das células com H₂DCF-DA e a fluorescência foi mensurada por citometria de fluxo (FACS). A genotoxicidade foi determinada pela formação de micronúcleos em células V79 após 24h de exposição ao HC, MTA cinza, POM e etilmetano sulfonato (controle positivo). O atraso do ciclo celular normal de células V79 foi analisado, após a exposição ao MTA cinza, HC, POM e TEGDMA (controle positivo) por FACS. As diferenças entre a taxa de sobrevivência celular, fluorescência, número de micronúcleos e distribuição de células no ciclo celular foram estatisticamente analisadas pelo teste de Mann-Whitney-U ($p \leq 0,05$). A citotoxicidade em relação ao grupo controle decresceu na seguinte ordem Vitrebond > HC > MTA branco = MTA cinza >>> POM. O POM causou indução da proliferação celular, enquanto o HC diminuiu a sobrevivência celular significativamente ($p < 0,05$). Nenhum material experimental causou aumento de níveis de ROS significativamente ($p > 0,05$). O Vitrebond aumentou os níveis de ROS em até 7 vezes ($p < 0,05$). Nenhum material experimental foi capaz de induzir aumento no número de micronúcleos e nem causar atraso o ciclo celular normal das células V79 em relação ao controle negativo. O POM e o MTA não foram citotóxicos e nem induziram a produção de ROS em células tHPC, já o HC apresentou citotoxicidade e um pequeno aumento na produção de ROS sobre as células tHPC. Todos os materiais experimentais não foram genotóxicos e nem causaram atraso no ciclo celular das células V79, evidenciando que estes materiais não são mutagênicos.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade; genotoxicidade; ROS; ciclo celular; hidróxido de cálcio; MTA; polímero da mamona.

1 INTRODUÇÃO

Na Endodontia, o desenvolvimento constante de novos materiais buscando biocompatibilidade, ação bactericida, indução de reparação e que proporcionam um selamento adequado visa que os procedimentos endodônticos tenham uma maior longevidade (DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003). Desta forma, o sucesso ou fracasso dos tratamentos endodônticos pode estar relacionado com a escolha do material a ser empregado (COHEN e HARGREAVES²³, 2006).

Idealmente, os materiais endodônticos deveriam possuir propriedades físico-químicas satisfatórias e apresentar boa tolerância ao tecido dentário e estruturas adjacentes. Entretanto, o sucesso clínico dos materiais, não depende apenas de suas propriedades físico-químicas, mas também de sua segurança biológica (SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006). A biocompatibilidade é de grande importância uma vez que estes materiais ficarão em contato direto com os tecidos dentários por longos períodos de tempo (MANTELLINI et al.⁵¹, 2003).

Portanto, materiais endodônticos deveriam ser exaustivamente testados quanto ao seu comportamento biológico antes de serem utilizados clinicamente. Com esse propósito, inicialmente experimentos em animais e testes em cultura celular devem ser aplicados. No entanto, os experimentos em animais para análise de citotoxicidade de materiais são dispendiosos, consomem bastante tempo e sua abrangência ainda é um assunto controverso na Literatura. Os métodos de cultura celular, por outro lado, são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, são melhores padronizados e reproduzíveis, sendo rápidos e fáceis na sua realização, além de possuírem custo relativamente baixo (CAMPS et al.¹⁶,

1992; HUANG e CHANG⁴⁰, 2002; SOUZA et al.⁹⁶, 2006; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagem a facilidade no controle dos fatores experimentais o que representa freqüentemente um problema em experimentos *in vivo* (HENSTEN-PETTERSEN³⁷, 1988; CAMPS et al.¹⁶, 1992; HUANG e CHANG³⁹, 2002; DE-DEUS et al.²⁴, 2005).

A *American Dental Association* (ADA) recomenda uma seqüência de testes de biocompatibilidade de materiais dentários que consiste em testes iniciais, secundários e diretamente *in vivo* (ACCORINTE et al.¹, 2005). Durante as últimas décadas, uma grande quantidade de sistemas *in vitro* foi desenvolvida para a avaliação do comportamento biológico de materiais (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem ser realizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou ensaio enzimático (CAMILLERI et al.¹⁴, 2004; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006). Os ensaios enzimáticos são capazes de medir a atividade metabólica do crescimento celular sobre materiais (CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006) e podem ser realizados pela interpretação da marcação celular com cromo radioativo, identificação do halo de inibição por contato direto material - célula, mensuração do grau de destruição da monocamada celular, contagem de células por exclusão com azul de Trypan (CAVALCANTI et al.²⁰, 2005), método do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (BOUILLAGUET et al.¹¹, 2002; DE-DEUS et al.²⁴, 2005), teste de cristal violeta (GILLIES et al.³⁴, 1986; SCHWEIKL et al.⁸⁸, 2005), entre outros.

O teste de cristal violeta é extremamente confiável e facilmente reproduzível, sendo utilizado para verificar a quantidade de células viáveis na avaliação de um material possivelmente tóxico. O corante violeta cristal é capaz de corar as proteínas presentes dentro do núcleo celular, e assim somente as células viáveis serão marcadas por este corante. O espectrofotômetro faz a leitura da densidade óptica das

células coradas pelo cristal violeta, sendo que quanto maior esta densidade, maior o número de células viáveis em uma amostra (GILLIES et al.³⁴, 1986).

Embora os métodos de cultura celular variem no modo de avaliação da citotoxicidade, dois tipos de células são amplamente utilizados: linhagem de células permanentes (derivadas de coleções obtidas comercialmente) e linhagens primárias oriundas de explantes celulares ou teciduais e, portanto estabelecidos em cada laboratório individualmente (SCHMALZ⁸¹, 1994; HUANG e CHANG³⁹, 2002; TAI et al.¹⁰², 2001; CAVALCANTI et al.²⁰, 2005; OKABE et al.⁶³, 2006).

O isolamento de células primárias de tecidos alvos é extensivamente trabalhosa e consome muito tempo, as células resultantes são freqüentemente poucas comparado ao ilimitado número de células obtido de linhagens de células contínuas e, além disso, células primárias possuem um tempo de vida limitado (PEREZ et al.⁷¹, 2003; DEMIRCI et al.²⁵, 2008). Estas falhas podem ser superadas pela criação de células primárias transformadas com um tempo de vida expandido, mas restando as propriedades das células originais (SCHMALZ e SCHWEIKL⁸², 1996; DEMIRCI et al.²⁵, 2008). Recentemente, linhagens celulares estáveis têm sido desenvolvidas após a transformação de células primárias bovinas e humanas derivadas da polpa com seqüências codificadas de oncogenes virais (THONEMANN e SCHMALZ¹⁰⁴, 2000; GALLER et al.³³, 2006). Dentre as linhagens de células permanentes encontram-se os fibroblastos de hamster Chinês (V79) que são utilizadas para mensurar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de substâncias (SCHMALZ⁸¹, 1994; SOUZA et al.⁹⁶, 2006; SCHWEIKL et al.⁸⁷, 2004). Estas células possuem um cariótipo estável, um tempo para reprodução curto e facilidade de manutenção (CAVALCANTI et al.¹⁹, 2006).

Entretanto, os resultados utilizando métodos de cultura celular para avaliar a citotoxicidade têm demonstrado que qualquer material odontológico pode ser tóxico ou não-tóxico, dependendo das

condições do teste e do tipo de células. Por isso, os testes de citotoxicidade *in vitro* deveriam ser realizados, preferencialmente, em células homólogas às do tecido humano simulando situações mais próximas clinicamente (HENSTEN-PETTERSEN³⁷, 1988; HUANG e CHANG³⁹, 2002; MANTELLINI et al.⁵¹, 2003).

Embora existam muitos estudos na Literatura para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários, poucos estudos analisaram possíveis danos que estes materiais podem causar ao DNA das células. Os testes de genotoxicidade podem ser realizados *in vitro* e *in vivo* e são capazes de detectar componentes, os quais induzem dano genético como quebra na cadeia de DNA, mutação gênica, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (CHANG et al.²², 1998; RIBEIRO et al.^{76, 77}, 2005; 2006). Além disso, os testes de genotoxicidade têm sido aceitos como um indicador de carcinogenicidade (RIBEIRO et al.⁷⁶, 2005).

Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* encontram-se o teste de cometa (CHANG et al.²², 1998; RIBEIRO et al.⁷⁷, 2006) e o de micronúcleo (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al.⁵, 2006, CAVALCANTI et al.¹⁹, 2006). O teste de micronúcleo (MNT) é utilizado para detecção de mutações cromossômicas no DNA celular (CAVALCANTI et al.¹⁹, 2006). Este teste é capaz de detectar clastógenos e aneugênicos, porque fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular normal (SCHWEIKL e SCHMALZ⁸⁶, 2000).

Entretanto, investigações de genotoxicidade *in vitro* ainda podem ser limitadas para caracterização de algumas alterações que os materiais dentários podem causar no metabolismo das células (SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são definidas como componentes que contêm oxigênio e possuem maior reatividade que o oxigênio molecular (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001). Nesta

definição estão incluídas moléculas de oxigênio como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como radicais de oxigênio tais como ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), radicais hidroxila (OH^-) e hidroperoxil (HO_2^-). Sabe-se que a fonte primária de ROS (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila) dentro das células advém de mitocôndrias, citocromo P450 e peroxidases (SHACKELFORD et al.⁹², 2000). Entretanto, ROS também são gerados de fontes externas como resultado da exposição de luz ultravioleta, radiação iônica, substâncias cromoterapêuticas e outros agentes ambientais (SHACKELFORD et al.⁹², 2000; SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006).

ROS são instáveis e estão prontos para reagir com outros componentes, mas nem sempre estas reações podem ser maléficas ao organismo (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001). Como consequência do metabolismo aeróbico fisiológico, apenas uma pequena quantidade de oxigênio sofre incompleta redução e assim pequenas quantidades de ROS são constantemente geradas em células e tecidos (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001; SILVEIRA⁹⁴, 2004; DEMIRCI et al.²⁵, 2008). Entretanto, se o estresse oxidativo persiste, diferentes componentes celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos podem sofrer oxidação devido ao ataque de ROS comprometendo as principais funções celulares (NORDBERG e ARNÉR⁶¹, 2001; SILVEIRA⁹⁴, 2004).

Para prevenir o dano oxidativo, as células eucarióticas têm desenvolvido um sistema de defesa complexo de moléculas reguladoras das reações de oxi-redução, que incluem antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos que atuam em conjunto para minimizar os efeitos de ROS no organismo (NORDBERG e ARNÉR⁶¹, 2001; BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001; SILVEIRA⁹⁴, 2004).

Entretanto, o desequilíbrio na estabilidade das reações de oxi-redução entre o ROS, gerado tanto internamente como externamente da célula, e os sistemas de proteção antioxidantes pode levar a morte

celular via apoptose. Apoptose é um processo fisiológico de morte celular o qual desempenha um papel crítico não apenas no desenvolvimento normal, mas também na patologia de uma variedade de doenças e na atividade de um grande número de agentes tóxicos (SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006).

Eventualmente, a instabilidade das reações de oxirredução devido à geração de oxigênio reativo pode causar dano do DNA endógeno, incluindo a oxidação dos sítios purínicos/pirimidínicos das bases do DNA e quebras na cadeia de DNA. A persistência de ROS induzindo este dano ao DNA pode resultar na geração de mutações deletérias (SILVEIRA⁹⁴, 2004; SCHWEIKL et al.^{90, 91}, 2006, 2007; DEMIRCI et al.²⁵, 2008).

Alguns materiais odontológicos podem ser capazes de gerar aumento de ROS dentro das células eucarióticas, induzindo citotoxicidade, bem como o atraso do ciclo celular. No ciclo celular normal das células eucarióticas, o sucesso completo das fases G1, S, e G2 é precisamente monitorado por vários sítios de controle. Estes sítios de controle ativam a resposta celular sob o dano do DNA por meio de atividades de proteínas sensoras, transdutoras e efetoras (NYBERG et al.⁶², 2002). O ciclo celular pode então, ser bloqueado para iniciar o reparo do DNA ou ativar a morte celular programada. Entretanto, defeitos nos sítios de controle do ciclo celular provocados por materiais são desastrosos para a integridade do genoma, porque eles podem conduzir a danos celulares irreversíveis, como mutações gênicas ou danos cromossômicos (NYBERG et al.⁶², 2002).

A modificação do ciclo celular normal na presença de alguns materiais pode ser analisada por citometria de fluxo (FACS) (SCHWEIKL et al.^{89, 91} 2005, 2007). Citometria de fluxo é uma técnica de mensuração das propriedades ópticas das células individuais, em um fluxo contínuo passando uma de cada vez, seqüencialmente, em frente a um feixe laser com sensores para medir fluorescência e dispersão de luz.

Assim, esta técnica analisa as células individualmente e por isso é capaz de detectar, não somente células viáveis e mortas, mas também uma variedade de estados fisiológicos celulares intermediários que realmente existem em uma determinada população de células. Além disso, a técnica de citometria de fluxo revela informações importantes como a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia das células (SILVA et al.⁹³, 2003).

Atualmente, existem diversas metodologias de análise do metabolismo celular de células eucarióticas quando expostas a materiais dentários (HUANG e CHANG³⁹, 2002; BOUILLAGUET et al.¹¹, 2002; SCHMALZ⁸⁴, 2002; SAIDON et al.⁸⁰, 2003; MANTELLINI et al.⁵¹, 2003; CAVALCANTI et al.²⁰, 2005; WANG et al.¹⁰⁹, 2006). As propriedades biológicas são tão importantes quanto às mecânicas e físico-químicas na seleção de um material para terapia endodôntica. Portanto, apenas os materiais com comprovação de uma aceitável tolerância tecidual decorrente de testes *in vivo* e *in vitro* deveriam ser considerados para o uso clínico (HAUMAN e LOVE³⁶, 2003).

Os resultados de testes *in vitro* e *in vivo* mostram que materiais endodônticos possuem tanto propriedades benéficas como indesejáveis. As propriedades indesejáveis podem ameaçar a saúde tecidual e/ou o tratamento endodôntico por causar efeitos adversos locais ou sistêmicos pelo contato direto com substâncias liberadas dentro dos tecidos dentários.

Portanto, os achados atuais ainda suscitam dúvidas no comportamento biológico de materiais endodônticos. Acredita-se que a reação dos tecidos dentários pode ser diferente entre os produtos disponíveis, dependendo da tolerância tecidual, podendo causar danos importantes a estes tecidos. Assim, é importante avaliar o comportamento biológico destes materiais em relação à citotoxicidade, bem como sua capacidade de causar danos ao material genético ou induzir atraso no ciclo celular de células eucarióticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão este capítulo foi subdividido. Primeiramente, descreveu-se sobre indicações e propriedades dos materiais endodônticos utilizados neste estudo. Em seguida, os testes *in vivo* de biocompatibilidade de materiais endodônticos e os testes *in vitro* de citotoxicidade, produção de ROS, genotoxicidade e análise do ciclo celular foram revisados.

2.1 Propriedades e indicações dos materiais endodônticos

O hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ possui como propriedades, indução de mineralização, baixa citotoxicidade e excelente ação antimicrobiana devido a sua alta alcalinidade (pH 12,8) (ACCORINTE et al.¹, 2005; WITHERSPOON et al.¹¹⁰, 2006). Devido suas propriedades, o hidróxido de cálcio tem sido durante muitos anos, o material de escolha para diversos procedimentos odontológicos como proteção pulpar direta e indireta, pulpotomia e medicação intracanal (ANDELIN et al.⁴, 2003; KARABUCAK et al.⁴⁴, 2005; KOLINIOTOU-KOUMPIA e TZIAFAS⁴⁶, 2005).

Em procedimentos de proteção pulpar direta, ele é capaz de estimular rapidamente a diferenciação de fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas em *odontoblastos-like* para a formação de uma barreira de tecido mineralizado sobre a polpa (MURRAY et al.⁵⁹, 2002; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; OKABE et al.⁶³, 2006; WITHERSPOON et al.¹¹⁰, 2006). Por outro lado, esta atividade não é exclusiva do hidróxido de cálcio, que também é uma substância que sofre desgaste mecânico e solubilidade ao longo do tempo permitindo falhas no selamento e

conseqüente microinfiltração (ANDELIN et al.⁴, 2003, SOUZA-COSTA et al.⁹⁷, 2003; KOLINIOTOU-KOUMPIA e TZIAFAS⁴⁶, 2005; LU et al.⁴⁹, 2006; ACCORINTE et al.², 2008). Além disso, possui pobre aderência ao tecido dentinário, mantém persistente inflamação e induz calcificação distrófica no tecido pulpar quando utilizado como material de proteção pulpar direta (ANDELIN et al.⁴, 2003).

O mineral trióxido agregado (MTA) foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, USA) por Torabinejad et al.¹⁰⁵ (1993) e desde então tem sido um material extensivamente pesquisado. O MTA consiste em 50–75% de óxido de cálcio e 15–25% de dióxido de silicato. Estes dois componentes juntos compreendem 70-95% do cimento e quando estes componentes são misturados produzem silicato tricálcio, silicato dicálcio, alumínio tricálcio e aluminoferrite tetracálcio (CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006; VAJRABHAYA et al.¹⁰⁸, 2006). Com a adição de água, o cimento sofre hidratação e forma um gel de silicato hidratado (CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006; WITHERSPOON et al.¹¹⁰, 2006).

O MTA apresenta propriedades antibacterianas devido ao seu pH alcalino (12,5), é insolúvel, dimensionalmente estável, apresenta bom selamento (ANDELIN et al.³, 2002; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; MENEZES et al.⁵⁵, 2004; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006) e ausência de citotoxicidade em cultura de células (HAUMAN e LOVE³⁶, 2003, TAKITA et al.¹⁰¹, 2006). Pode ser utilizado como material retrobturador em cirurgias apicais (ANDELIN et al.³, 2002; BERNABÉ et al.⁹, 2005; FRIDLAND e ROSADO³¹, 2005; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006, BERNABÉ et al.¹⁰, 2007), em procedimentos de proteção pulpar direta e indireta e pulpotomia (FRIDLAND e ROSADO³¹, 2005; DE-DEUS et al.²⁴, 2005; PATEL e COHENCA⁶⁸, 2006; WITHERSPOON et al.¹¹⁰, 2006; GUVEN et al.³⁵, 2007) e como material selador de perfurações radiculares (PITT FORD et al.⁷², 1995; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; SAIDON et al.⁸⁰, 2003; HAUMAN e LOVE³⁶, 2003; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005; FRIDLAND e ROSADO³¹, 2005,

NOETZEL et al.⁶⁰, 2006). Estudos avaliando MTA como material retrobturador mostraram a ocorrência de pequena inflamação periapical, formação de cápsula fibrosa e de novo cimento em contato com a superfície do material (TORABINEJAD et al.¹⁰⁶, 1995; BERNABÉ et al.⁹, 2005).

Como material de proteção pulpar direta, o MTA é capaz de induzir formação de barreira de tecido duro na polpa (HOLLAND et al.³⁸, 2002; ANDELIN et al.⁴, 2003; BERNABÉ et al.⁹, 2005; PATEL e COHENCA⁶⁸, 2006), provocar menor reação inflamatória, além de criar barreiras com espessuras significativamente maiores quando comparado ao cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ANDELIN et al.⁴, 2003).

Entretanto, a cor cinza do MTA original pode causar manchamento nos dentes, principalmente quando usado como selador de perfurações ou protetor pulpar direto em dentes anteriores. Portanto, foi desenvolvido o MTA branco para minimizar este inconveniente (PEREZ et al.⁷¹, 2003). Estes materiais apresentam diferença na concentração de alumínio, magnésio e compostos de ferro, sendo que o MTA branco possui apenas 1,2% de óxido ferroso (FeO) responsável pela cor do MTA cinza (CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006; ROBERTS et al.⁷⁸, 2008). Apesar da composição diferente, estudos revelam que os mecanismos de ação do MTA cinza e branco são similares (HOLLAND et al.³⁸, 2002; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005).

Atualmente, é bem aceito o fato que produtos naturais, especialmente aqueles derivados de extratos vegetais ou da fermentação de bactérias, possam produzir medicamentos ou materiais mais biocompatíveis (FRANCISCO²⁹, 1998; SABIR et al.⁷⁹, 2005; ANDRIGUETTI-FRÖHER et al.⁵, 2006). Entretanto, todo medicamento fitoterápico deve ser testado quanto à sua toxicidade (MAISTRO et al.⁵⁰, 2004; CAVALCANTI et al.¹⁹, 2006). O polímero derivado do óleo de mamona (POM) é obtido a partir do extrato de uma planta de nome científico *Ricinus communis* (LAMANO CARVALHO et al.⁴⁸, 1997). Este

material é um poliéster formado por um radical amino que lhe confere ação bactericida e ao mesmo tempo biocompatibilidade com os tecidos vivos (CALIXTO et al.¹², 2001; FERREIRA et al.²⁸, 2002; PERASSI⁷⁰, 2004; SOUZA-JUNIOR et al.⁹⁹, 2004). Apresenta aspectos favoráveis de processabilidade, flexibilidade de formulação, excelentes propriedades estruturais, além de não liberar vapores e radicais tóxicos e ser de baixo custo (IGNÁCIO et al.⁴², 2002; BARROS et al.⁶, 2003). Na Endodontia, este material tem sido utilizado no preenchimento de retrobturações em cirurgias paraendodônticas, cimento obturador de canais radiculares (PASCON et al.⁶⁷, 2001; PERASSI⁷⁰, 2004) e como agente irrigante (FERREIRA et al.²⁸, 2002; SOUZA-JUNIOR et al.⁹⁹, 2004; MEDICI e FRÖNER⁵⁴, 2006).

2.2 Testes de biocompatibilidade *in vivo* de materiais endodônticos

Atualmente, temos disponíveis no mercado odontológico uma infinidade de materiais que podem permanecer em contato com tecidos dentários e estruturas adjacentes por longos períodos de tempo (SCHMALZ⁸¹, 1994). Dentro dos procedimentos endodônticos, os materiais podem entrar em contato com o tecido pulpar (direta ou indiretamente) e/ou com os tecidos periapicais e osso alveolar. Portanto, é importante que se tenham materiais suficientemente compatíveis capazes de permitir a manutenção da viabilidade do tecido remanescente ou ainda estimular o processo de reparação.

Entretanto, devido à diversidade de respostas teciduais para diferentes situações clínicas, muitos materiais com diferentes composições têm sido sugeridos (COHEN e HARGREAVES²³, 2006; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; OLSSON et al.⁶⁴, 2006). Para a análise destes materiais dentários que possivelmente promoverão respostas

teciduais, estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados utilizando diferentes metodologias. Embora estudos em animais sejam necessários e seus resultados apresentem geralmente informações relevantes, deve-se ter cuidado ao extrapolar os resultados dos testes em animais para os seres humanos (ACCORINTE et al.¹, 2005).

O hidróxido de cálcio tem sido durante muitos anos, o material de escolha para diversos procedimentos endodônticos como proteção pulpar direta e indireta, pulpotomia e medicação intracanal (ANDELIN et al.⁴, 2003; KARABUCAK et al.⁴⁴, 2005; KOLINIOTOU-KOUMPIA e TZIAFAS⁴⁶, 2005). Assim, estudos *in vivo* foram realizados para avaliação da biocompatibilidade deste material quando em contato com os tecidos dentários.

Souza-Costa et al.⁹⁷ (2003) e Souza-Costa et al.⁹⁸ (2003) se propuseram a avaliar a resposta do complexo dentino-pulpar comparando um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) e um adesivo dentinário ao cimento de Ca(OH)_2 (Dycal) nos procedimentos de proteção pulpar direta. Os autores relatam que após 30 dias o adesivo dentinário causou resposta inflamatória mais evidente e severa que o Vitrebond e o Dycal em dentes humanos (SOUZA-COSTA et al.⁹⁷, 2003) e de ratos (SOUZA-COSTA et al.⁹⁸, 2003). Apesar de ter sido encontrado uma barreira de tecido dentinário mais completa nos dentes tratados com Dycal, os autores concluem que o Vitrebond e o Dycal foram biocompatíveis e podem ser utilizados como materiais para proteção pulpar direta.

Ainda a resposta *in vivo* de dentes humanos ou de cães com vitalidade pulpar capeados com diferentes sistemas adesivos e com cimento de Ca(OH)_2 (Dycal) foi avaliada por Koliniotou-Koumpia e Tziafas⁴⁶ (2005), Lu et al.⁴⁹ (2006) e Tziafas et al.¹⁰⁷ (2007). De uma maneira geral, os autores relatam que após 60 dias, a aplicação dos adesivos dentinários em contato direto com o tecido pulpar exposto não permitiu um adequado reparo do complexo dentino-pulpar e nem

formação de barreira dentinária. Em contrapartida, os dentes capeados com cimento de Ca(OH)_2 promoveram a formação de uma barreira dentinária, sendo considerado um material biocompatível ao complexo dentino-pulpar. Accorinte et al.¹ (2005) também verificaram os mesmos resultados utilizando o pó de Ca(OH)_2 . Portanto, concluíram que adesivos dentinários deveriam ser evitados para a realização da proteção pulpar direta e o cimento ou pó de Ca(OH)_2 deveria ser o material de primeira escolha.

Entretanto, Lu et al.⁴⁹ (2006) relatam que o adesivo dentinário mostrou boa biocompatibilidade ao tecido pulpar, mas que a capacidade de induzir reparação dentinária deste material foi mais baixa que o cimento de Ca(OH)_2 . Ainda Tziafas et al.¹⁰⁷ (2007) mostraram que um adesivo experimental manteve a vitalidade pulpar, entretanto interferiu com a formação de dentina reparadora nas cavidades com exposição pulpar.

As reações do tecido pulpar de dentes de cães na proteção pulpar direta com clorexidina 0,2% ou cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) foram comparadas microscopicamente. Após 12 e 15 semanas da realização da proteção pulpar direta, a clorexidina e o cimento de hidróxido de cálcio causaram respostas teciduais leves quando utilizados como materiais de proteção pulpar direta concluindo que podem ser utilizados com esta finalidade (THOMAS et al.¹⁰³, 1995).

Além do hidróxido de cálcio, outro material bastante empregado nos procedimentos endodônticos é o agregado trióxido mineral (MTA). Este apresenta propriedades antibacterianas devido ao seu pH alcalino (12,5), é insolúvel, apresenta bom selamento, estabilidade dimensional (ANDELIN et al.³, 2002; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; MENEZES et al.⁵⁵, 2004; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006) e biocompatibilidade (HAUMAN e LOVE³⁶, 2003; TAKITA et al.¹⁰¹, 2006).

Fridland e Rosado³¹, em 2005, avaliaram a quantidade de material solúvel liberada pelo MTA em água para determinar se a solubilidade e o pH deste material são mantidos ao longo do tempo. Os espécimes foram confeccionados na proporção de 0,28 e 0,33 água/pó e imersos em água de acordo com o padrão da ISO 6876. Após 78 dias verificou-se que o MTA solubilizou apenas 22,06% (0,28 água/pó) e 31,09% (0,33 água/pó) e manteve um pH alto durante todo o período deste estudo.

Devido suas propriedades o MTA é indicado em procedimentos de proteção pulpar e pulpotomia, como material retrobturador em cirurgias apicais (ANDELIN et al.³, 2002; HUANG et al.⁴¹, 2003; BERNABÉ et al.⁹, 2005; CAMILLERI e PITT FORD¹⁵, 2006), e como material selador em perfurações (DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; SAIDON et al.⁸⁰, 2003; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005).

Clinicamente, a proteção pulpar direta bem sucedida com MTA pode prevenir a necessidade de um tratamento endodôntico radical de dentes permanentes. Patel e Cohenca⁶⁸, em 2006, apresentaram um caso clínico utilizando o MTA como material para proteção pulpar direta. As avaliações clínicas e radiográficas demonstraram vitalidade pulpar após 11 meses do tratamento, observando-se que o MTA pode ser considerado um material eficiente para a terapia de polpa com vitalidade.

Com o advento do MTA, a eficiência do cimento de Ca(OH)_2 para procedimentos de proteção pulpar direta e pulpotomia passou a ser questionado, uma vez que Pitt Ford et al.⁷³ (1996), Faraco e Holland²⁷ (2001) e Dominguez et al.²⁶ (2003) comparando estes dois materiais em testes *in vivo* em animais, observaram que com o MTA, a inflamação pulpar era menos evidente e que havia uma produção de barreira dentinária tubular e contínua com o tecido original. Ao contrário, o cimento de Ca(OH)_2 induziu formação de barreira dentinária distrófica e causou inflamação persistente.

Chacko et al.²¹ (2006) compararam a resposta histológica pulpar do MTA branco e o cimento de Ca(OH)_2 como materiais de pulpotomia em premolares com indicação ortodôntica, relatando que o MTA branco induziu uma barreira dentinária mais homogênea e contínua com menor inflamação pulpar que o cimento de Ca(OH)_2 após 4 e 8 semanas do tratamento de pulpotomia.

Em contrapartida em um estudo realizado em humanos por Accorinte et al.² em 2008, verificou-se que o MTA e o cimento de Ca(OH)_2 apresentaram formação completa ou parcial de barreira dentinária e resposta inflamatória similar. Entretanto, uma baixa resposta para formação de barreira dentinária foi observado no cimento de Ca(OH)_2 após 30 dias, quando comparado ao MTA (30 e 60 dias). Embora o reparo pulpar com cimento de Ca(OH)_2 tenha sido menor que com MTA, ambos os materiais tiveram sucesso na proteção pulpar direta em dentes humanos.

Recentemente, foi criado o MTA de coloração branca, uma vez que o MTA original cinza pode causar manchamento nos dentes, principalmente quando usado como selador de perfurações ou protetor pulpar direto em dentes anteriores (PEREZ et al.⁷¹, 2003). Assim, alguns estudos foram realizados com intuito de comparar as propriedades biológicas destes dois materiais (HOLLAND et al.³⁸, 2002; MENEZES et al.⁵⁵, 2004; PARIROKH et al.⁶⁶, 2005).

A reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos foi avaliada por Holland et al.³⁸, em 2002, e após a implantação de tubos de dentina preenchidos com MTA branco ou cinza, a resposta inflamatória foi leve aos 7 e 30 dias da implantação e a formação de uma estrutura irregular semelhante à barreira dentinária foi observada próxima aos materiais. Estes resultados foram semelhantes ao MTA cinza e branco, indicando que as propriedades biológicas destes materiais são similares.

Os estudos de Menezes et al.⁵⁵ (2004) e Parirokh et al.⁶⁶ (2005) avaliaram a resposta pulpar de dentes de cães após a proteção

pulpar direta ou pulpotomia com MTA branco e cinza. Os autores relataram que os materiais apresentaram resultados similares, sendo que a vitalidade pulpar foi mantida em todos os espécimes. Além disso, ocorreu reparo pulpar e formação de barreira dentinária completa. Os materiais foram efetivos tanto no procedimento de proteção pulpar direta como pulpotomia.

Biocompatibilidade é uma das mais importantes propriedades de um material indicado como retrobturador apical, pois este material ficará em contato permanente com os tecidos vivos na região periapical (SOUSA et al.⁹⁵, 2004).

Os efeitos do MTA foram comparados *in vivo* quando usado como material para obturação retrógrada, no processo de reparo dos tecidos periapicais de dentes de cães submetidos à técnica de retrobturação convencional. Os autores relatam que o MTA foi capaz de reduzir a inflamação periapical e a resposta tecidual, mesmo na ausência de obturação do canal radicular e restauração coronária e, além disso, permitiu reparo dos tecidos periradiculares com formação de tecido duro semelhante ao cimento (BERNABÉ et al.^{9, 10}, 2005; 2007).

Ainda, o MTA quando avaliado em implantes ósseos em mandíbulas de porcos apresentou, após 4 e 12 semanas da implantação, excelente qualidades biológicas com proliferação celular no tecido ósseo em contato com o material e sem interposição de tecido conjuntivo, sendo considerado um material biocompatível nas condições deste estudo (SOUSA et al.⁹⁵, 2004).

O MTA também é indicado para selamento de perfurações de furca acidentais. Pitt Ford et al.⁷² (1995) e Noetzel et al.⁶⁰ (2006) avaliaram a resposta tecidual a perfurações intencionais em dentes de cães. Pitt Ford et al.⁷² (1995) verificaram que após 4 meses, o MTA não exibiu inflamação e ainda promoveu formação de cimento na região. Portanto, observou-se que o MTA é um material biocompatível e indicado para o selamento de perfurações. Entretanto, Noetzel et al.⁶⁰ (2006)

observaram que após 3 meses, o MTA ainda exibiu inflamação leve e formação de tecido conjuntivo fibroso na área da perfuração.

Como observado anteriormente o MTA tem sido extensivamente pesquisado e a maioria dos estudos tem mostrado que o MTA é um material biocompatível *in vivo* (DE-DEUS et al.²⁴, 2005), entretanto é importante a busca de outros materiais que apresentem comportamento biológico ainda melhor e que também possam ser utilizados nos procedimentos endodônticos.

O POM tem sido bastante empregado na Medicina como material de reconstrução, substituição ou preenchimento de defeitos ósseos, apresentando resultados bastante promissores e já estabelecidos (FRANCISCO²⁹, 1998; IGNÁCIO et al.⁴², 2002).

Visando acrescentar informações sobre suas propriedades biológicas e possibilidade de uso em áreas específicas da Odontologia, Lamano Carvalho et al.⁴⁸ (1997) e Calixto et al.¹² (2001) testaram a biocompatibilidade de um floculado de resina de mamona, comercialmente disponível, utilizando como modelo experimental o reparo ósseo alveolar de ratos. O material (polímero da mamona, Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda., Araraquara - SP) foi implantado no alvéolo de ratos e os resultados mostraram que a presença do material nos terços médio e cervical provocou um atraso discreto (9%-22%) no reparo ósseo apical. Apesar deste atraso, os autores concluíram que os flocos de resina poliuretana de mamona, implantados na cavidade de extração dentária de ratos, mostraram-se biocompatíveis e capazes de certo grau de osseointegração direta.

Barros et al.⁶ (2003) avaliaram o comportamento biológico do poliuretano vegetal de óleo de mamona após o implante de discos deste material sem ou com carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio em fêmur de coelhos. Os resultados mostraram que todos os implantes, independente da composição, foram biocompatíveis demonstrado pela qualidade do tecido na interface osso-material e pela capacidade de osseointegração.

Ainda Mastrantonio e Ramalho⁵³ (2003) avaliaram histologicamente a resposta de tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos, após o implante de discos do poliuretano vegetal de óleo de mamona sem e com carbonato de cálcio, e mostraram que ambas as formas são biocompatíveis, sendo observado que ocorreu discreta reação inflamatória somente no período inicial (7 dias).

Além disso, o POM tem sido utilizado, especificamente na área endodôntica, como material para cimento obturador de canais radiculares (PERASSI⁷⁰, 2004), irrigação do canal radicular (FERREIRA et al.²⁸, 2002; MEDICI e FRÖNER⁵⁴, 2006) e retrobturador em cirurgias paraendodônticas (MARTINS et al.⁵², 2005).

Perassi⁷⁰, em 2004, avaliou a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, após a implantação de tubos de polietileno preenchidos com um cimento experimental derivado do polímero da mamona (Poliquil), Endorez, Endofill e Sealapex. Após 7 e 50 dias, as análises revelaram discreto ou moderado infiltrado inflamatório nos materiais testados durante os dois períodos, com exceção do cimento experimental derivado do polímero da mamona, o qual aos 50 dias não observou-se infiltrado inflamatório apresentando bom comportamento biológico. Ainda Camargo et al.¹³ (2007) avaliaram a biocompatibilidade do polímero derivado do óleo da mamona (POM, Poliquil) comparado ao cimento de Ca(OH)_2 (Hydro C) em tecidos subcutâneos de ratos. Após 7 dias, não houve diferença significativa entre as reações teciduais do Hydro C (382 células inflamatórias) e POM (330) ($p=0,111$). Entretanto, após 50 dias, a média de células inflamatórias foi significativamente maior no Hydro C (404) que no POM (177) ($p=0,02$). Estes resultados sugerem que o POM foi capaz de induzir menor resposta inflamatória em longos períodos de observação, portanto pode ser mais biocompatível para procedimentos odontológicos.

Como agente irrigante em procedimentos endodônticos, o polímero derivado do óleo da mamona foi avaliado quanto a sua atividade

antimicrobiana (FERREIRA et al.²⁸, 2002) e quanto a sua ação na remoção da *smear layer* (MEDICI e FRÖNER⁵⁴, 2006). O polímero derivado do óleo da mamona apresentou atividade antibacteriana efetiva sobre microorganismos anaeróbicos, entretanto esta atividade ainda foi menor que a clorexidina 2% (FERREIRA et al.²⁸, 2002). Quanto à ação na limpeza dos canais radiculares, este material não apresentou muita eficiência na remoção da *smear layer* das paredes dentinárias, uma vez que não foi capaz de dissolver o tecido orgânico, sendo sua ação equivalente ao hipoclorito de sódio 1% (MEDICI e FRÖNER⁵⁴, 2006).

A capacidade de selamento do POM como material retrobturador foi avaliado *in vitro* por Martins et al.⁵² (2005). Após 24 h de imersão ao corante rodamina B, o POM apresentou melhor capacidade seladora significativamente em relação ao cimento de ionômero de vidro e MTA. Ainda Pavan et al.⁶⁹ (2003) relatam que após 48 h de imersão em solução de azul de metileno 25%, o POM apresentou um ótimo selamento. Portanto, o POM tem potencial para ser utilizado como material retrobturador.

2.3 Ensaio de citotoxicidade

Além dos testes de biocompatibilidade *in vivo* (secundários), os testes *in vitro* (primários) podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários. Os produtos devem ser submetidos aos testes secundários somente nos casos em que obtiveram resultados satisfatórios nos testes primários. A coerência entre os resultados dos testes primários é necessária antes da realização dos testes secundários (CAMPS et al.¹⁶, 1992). Assim, a avaliação biológica de materiais deveria iniciar com um estudo do mecanismo de ação dos produtos citotóxicos utilizando para isso os testes *in vitro*. Posteriormente,

deveriam ser realizados os testes *in vivo* para avaliação do comportamento biológico do material.

Portanto, recentemente, muitas pesquisas estão desenvolvendo estudos de citotoxicidade para materiais odontológicos *in vitro*, utilizando modelos em cultura de células provenientes de linhagens obtidas comercialmente e culturas primárias estabelecidas em laboratórios individualmente (SOUZA et al.⁹⁶, 2006). Estes estudos possuem grande importância na avaliação prévia do comportamento biológico dos materiais frente aos tecidos (THOMAS et al.¹⁰³, 1995; HUANG e CHANG³⁹, 2002; BOUILLAGUET et al.¹¹, 2002; SCHMALZ⁸⁴, 2002; MANTELLINI et al.⁵¹, 2003; SAIDON et al.⁸⁰, 2003; CAVALCANTI et al.²⁰, 2005; WANG et al.¹⁰⁹, 2006).

Entretanto, as metodologias dos estudos para análise da citotoxicidade de materiais dentários variam tanto no tipo de teste como no tipo de culturas celulares, muitas vezes dificultando a comparação destes materiais quanto as suas propriedades biológicas.

A determinação dos efeitos citotóxicos de materiais em cultura de células requer técnicas rápidas, reproduzíveis e capazes de monitorar estes efeitos em função do tempo. Alguns métodos para analisar os efeitos citotóxicos são estáticos ou indiretos, ou seja, eles são designados para avaliar estes efeitos associados somente a processos celulares, como a integridade da membrana celular. Devido as limitações destes métodos, Gillies et al.³⁴ (1986) realizaram um estudo para criar um método capaz de determinar rapidamente o número de células viáveis em culturas celulares. Os autores verificaram que o manchamento do núcleo celular com corante cristal violeta permite a quantificação rápida e reproduzível do número de células em culturas celulares em condições padronizadas. A quantificação é possível pela solubilização do corante cristal violeta dentro de uma solução de Triton X-100 e a determinação da densidade óptica pelo espectrofotômetro. Esta técnica é aplicável para o

estudo de materiais os quais podem afetar a proliferação celular (GILLIES et al.³⁴, 1986).

Os efeitos citotóxicos do cimento de Ca(OH)_2 foram avaliados sobre cultura de células pulpareas humanas e os resultados pelo método do azul de Trypan mostraram que este material não prejudicou o crescimento celular, sendo deste modo considerado não citotóxico (CAVALCANTI et al.²⁰, 2005). Entretanto, quando comparado ao MTA, o cimento de Ca(OH)_2 (Dycal) não apresentou um bom comportamento biológico em células humanas pela análise em MEV, uma vez que o MTA promoveu alto crescimento celular e não foi citotóxico, sendo um material adequado para procedimentos clínicos (MITCHELL et al.⁵⁷, 1999). Este estudo foi reforçado por Takita et al.¹⁰¹ (2006) que relatam que o MTA branco (ProRoot) induziu maior proliferação celular em células pulpareas humanas que o cimento de Ca(OH)_2 (Dycal).

Ainda, Min et al.⁵⁶ (2007) relatam que o cimento de Ca(OH)_2 (Dycal) apresentou uma taxa de sobrevivência celular de menos de 40% em células pulpareas humanas após ensaio de MTT. Enquanto que o cimento Portland não apresentou citotoxicidade, permitiu a expressão de genes relacionados com a formação de tecido mineralizado nas células pulpareas e, portanto possui potencial para ser utilizado como material de proteção pulpar direta.

Em uma linhagem de células endoteliais humanas, verificou-se que o cimento Portland e MTA (ProRoot e Angelus), inicialmente mostraram um efeito citotóxico elevado após ensaio de MTT, o qual diminuiu com o tempo permitindo que a cultura celular se restabelecesse (DE-DEUS et al.²⁴, 2005).

Efeitos citotóxicos do MTA comparados a um cimento ionômero de vidro foram avaliados em células humanas do ligamento periodontal (KARIMJEE et al.⁴⁵, 2006; VAJRABHAYA et al.¹⁰⁸, 2006). Os autores demonstraram que o MTA (ProRoot) apresentou uma maior porcentagem de células viáveis após ensaio de MTT. Além disso, este

material não foi citotóxico em células humanas do ligamento periodontal sendo melhor que o cimento ionômero de vidro.

A citotoxicidade do MTA também foi avaliada em células de osteosarcoma humanos e os resultados foram semelhantes aos descritos anteriormente, em que o MTA é um material não citotóxico (HUANG et al.⁴¹, 2003; CAMILLERI et al.¹⁴, 2004). Apesar de métodos diferentes, o MTA não induziu citotoxicidade tanto por análise em MEV (CAMILLERI et al.¹⁴, 2004) como pelo ensaio de MTT (HUANG et al.⁴¹, 2003). Nesta mesma linhagem celular, Perez et al.⁷¹ (2003) relatam após análise em MEV, que as células de osteosarcoma humanos foram capazes de se aderirem na superfície do MTA, evidenciando o potencial de reparo deste material.

Os efeitos citotóxicos de duas marcas comerciais de MTA (ProRoot e Angelus) foram avaliados em fibroblastos gengivais humanos (HGFs). Pelo ensaio de MTT, a viabilidade celular dos materiais foi significativamente mais baixa do que o grupo controle após 24 h ($p < 0,005$), mas mostrou um aumento em 72 h. Estes resultados sugerem que ambos os materiais são biocompatíveis às células HGFs (GUVEN et al.³⁵, 2007).

O MTA também tem sido reportado ser não citotóxico a um modelo experimental de osteoblastos humanos. Koh et al.⁴⁷ (1998) avaliaram a morfologia de osteoblastos por MEV na presença de MTA e ainda a produção de citocinas por estas células. Os autores observaram células com aspecto normal em contato com o MTA em 1 a 3 dias e expressão de interleucinas pelas células na presença deste material. Concluíram que o MTA ofereceu substrato biológico para células ósseas e estimulou a produção de interleucinas responsáveis pela diminuição do processo inflamatório.

De uma maneira geral, os resultados de citotoxicidade do MTA sobre as células humanas são concordantes em relação à baixa toxicidade deste material. Nas células de ratos foi verificado que os MTA

(ProRoot e Angelus) também não foram citotóxicos para linhagens de células V79 e macrófagos murinos após ensaio de MTT (SOUZA et al.⁹⁶, 2006). Além disso, a avaliação do MTA (ProRoot) e cimento Portland sobre cultura de células de ratos (L929) e em mandíbulas de porcos não mostrou citotoxicidade destes materiais quando avaliados *in vitro* e *in vivo* (SAIDON et al.⁸⁰, 2003). Ainda Osorio et al.⁶⁵ (1998) verificaram pelo ensaio de MTT que o MTA não foi citotóxico para células L929 nem para fibroblastos humanos gengivais.

Como o polímero derivado do óleo da mamona ainda é um cimento experimental na Odontologia, a análise da citotoxicidade deste material na Literatura é escassa.

Pascon et al.⁶⁷, em 2001, compararam a toxicidade do polímero da mamona, *in vitro* e *in vivo*, com quatro cimentos endodônticos comerciais (AH26, Dentinol, Kerr Pulp Canal Sealer, e Sealapex) com a finalidade de ser utilizado como cimento de obturação endodôntica. O método *in vitro* utilizado foi o de liberação de cromo radioativo em cultura de células L929 e observou-se que o polímero da mamona apresentou baixa citotoxicidade. No método *in vivo*, verificou-se que todos os materiais, com exceção do polímero de mamona, apresentaram reação inflamatória que variava de leve a moderada. Esses resultados permitiram concluir que o polímero é um material mais biocompatível, apresentando condições biológicas em ensaios *in vivo* para sua utilização como material de obturação de canal radicular.

Beloti et al.⁸ (2003) verificaram *in vitro* que o polímero de mamona com carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio permitiram uma boa adesão e proliferação de células da medula óssea de ratos, sendo considerado um material não citotóxico.

No presente estudo, um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) foi utilizado como controle positivo, pois é um material que apresenta efeitos citotóxicos comprovados em culturas de células, assim uma breve revisão foi feita em relação a este material.

O efeito citotóxico de cimentos ionômero de vidros sobre culturas tridimensionais derivadas da polpa dentária foi avaliado pelo teste de barreira dentinária e pelo ensaio de MTT. O Vitrebond apresentou taxa de sobrevivência celular significativamente baixa, mostrando ser um material extremamente citotóxico (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001; GALLER et al.³², 2005). Na análise em células pulpares humanas primárias, os resultados mostraram que os cimentos ionômero de vidros também foram citotóxicos. Os autores concluem que estes materiais poderiam constantemente liberar substâncias após serem expostos aos tecidos por longos períodos, possivelmente causando reações moderadas de citotoxicidade e ainda possivelmente contribuindo para irritação pulpar (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002).

2.4 Teste de ROS

Em situações fisiológicas, ROS são conhecidos como mediadores dos sinais da cascata intracelular. No entanto, a excessiva produção de ROS pode conduzir ao estresse oxidativo, perda da função celular seguido de apoptose ou necrose. Além disso, altos níveis de ROS, se não forem controlados pelos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos celulares, causam injúrias e danos em importantes biomoléculas incluindo proteínas celulares, lipídeos e DNA (SPAGNUOLO et al.¹⁰⁰, 2006). Portanto, um equilíbrio entre os sistemas intracelulares oxidantes e antioxidantes é fundamental para a função, regulação e adaptação a diversas condições de crescimento celular (NORDBERG e ARNÉR⁶¹, 2001).

O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GPr), tioredoxina (Trx), tioredoxina reductase

(TrxR), catalase (CAT), e outras enzimas relacionadas ou reguladoras desta expressão. Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido, hidroperóxidos orgânicos e H_2O_2 (SILVEIRA⁹⁴, 2004). A SOD é capaz de catalisar as reações de redução e oxidação simultânea de duas moléculas de radicais de O_2^- para formar H_2O_2 e oxigênio (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001). O sistema antioxidante não-enzimático inclui, principalmente, as vitaminas E, C, e A, ubiquinona, ácido úrico, L-cisteína, enilalanina e glicose. A maioria desses antioxidantes está estrategicamente localizada em organelas celulares para proporcionar o máximo de proteção contra os danos causados pelos ROS (SILVEIRA⁹⁴, 2004).

No organismo existe um sistema de enzimas antioxidantes celulares, como a enzima glutatona, que agem em conjunto para destruir o excesso de moléculas reativas de oxigênio. Em uma condição de inflamação da polpa dentária ocorre liberação de uma grande quantidade de ROS que muitas vezes não é destruída pelas enzimas antioxidantes da célula. Portanto a suplementação exógena de um sistema de defesa antioxidante pode limitar a severidade da resposta inflamatória (DEMIRCI et al.²⁵, 2008).

Um estudo de Baumgardner e Sulfaro⁷, em 2001, examinou os efeitos da superóxido dismutase (SOD) sobre a inflamação pulpar induzida por preparos cavitários padronizados em molares de ratos. A extensão da inflamação pulpar foi comparada histomorfometricamente entre animais tratados com a administração exógena de uma enzima antioxidante recombinante humana conjugada ao polietilenoglicol (hr-CuZn-SOD), ou tratados com solução salina (controle). Houve uma redução estatisticamente significativa na área da inflamação em animais tratados com hr-CuZn-SOD, em relação ao grupo controle. Embora a administração de hr-CuZn-SOD não eliminou completamente o processo inflamatório nos animais tratados, verificou-se

menor severidade na resposta inflamatória e melhor grau de reparo do tecido dentinário.

Alguns materiais odontológicos são capazes de causar um aumento da produção de ROS nas células. Portanto, estudos têm sido realizados para a verificação da geração de ROS em células eucarióticas frente a estes materiais (REZENDE et al.⁷⁵, 2007; DEMIRCI et al.²⁵, 2008).

Um exemplo são as resinas compostas e os adesivos dentinários polimerizáveis os quais liberam monômeros residuais que podem interagir com o tecido pulpar. Demirci et al.²⁵ (2008) relatam que adesivos dentinários podem causar citotoxicidade em células pulpares via geração de ROS o que pode também contribuir para os efeitos genotóxicos *in vitro*. A citotoxicidade de adesivos dentinários foi analisada pelo ensaio do cristal violeta em células pulpares humanas transformadas (tHPC) após 24 h. A geração de ROS foi mensurada após 1h de exposição por citometria de fluxo (FACS) e a genotoxicidade foi determinada pelo teste MNT em células V79 após 24h de exposição. Os adesivos dentinários diminuíram a sobrevivência das células e em todos os materiais verificou-se que houve aumento de produção de ROS pelas células pulpares. Apenas um adesivo dentinário aumentou o número de micronúcleos significativamente mostrando ser potencialmente genotóxico. Os resultados sugerem que o potencial citotóxico demonstrado por estes materiais pode ser clinicamente relevante, uma vez que os adesivos dentinários alteraram o equilíbrio redox das células pulpares. De acordo com estes resultados, as concentrações de ingredientes biologicamente ativos de alguns agentes podem ser altas suficientes para modificar o metabolismo das células pulpares quando os materiais são utilizados em cavidades profundas ou diretamente em contato com o tecido pulpar.

A influência do MTA na produção de espécies intermediários reativos de oxigênio (ROI) e de nitrogênio (NO) e na capacidade de fagocitose foi avaliada em macrófagos peritoniais (M1 e

M2) por Rezende et al.⁷⁵ (2007). Os M2 demonstraram maior viabilidade celular, maior capacidade de fagocitose e menor produção de ROI quando comparados ao M1. O MTA não interferiu com qualquer dos parâmetros mensurados sendo que, a fagocitose e a capacidade de eliminar microorganismos dos M1 e M2 não foram afetadas por este material.

2.5 Ensaio de genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade e citotoxicidade formam uma importante parte da pesquisa do câncer e da avaliação de risco de carcinógenos potenciais em materiais odontológicos (CHANG et al.²², 1998; RIBEIRO et al.⁷⁶, 2005). Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vivo* e *in vitro* designados para detectar componentes que induzam dano genético, incluindo dano ao DNA, mutação genética, quebra cromossômica, alteração na capacidade de reparo do DNA e transformação celular (CHANG et al.²², 1998; RIBEIRO et al.⁷⁷, 2006).

Recentemente, o MTA (cinza e branco) e o cimento Portland têm sido utilizados como materiais de obturação retrógrada. Portanto, é necessária a obtenção de resultados consistentes destes materiais acerca da genotoxicidade. Assim, Ribeiro et al.⁷⁶ (2005) e Ribeiro et al.⁷⁷ (2006) examinaram a genotoxicidade e citotoxicidade do MTA branco e cinza e do cimento Portland *in vitro* pelo teste do cometa e teste de exclusão pelo azul de Trypan, respectivamente. Os resultados sugerem que os materiais não são genotóxicos e não são capazes de interferir na viabilidade celular em dois tipos de linhagem de células (células de linfoma murino e células de ovários de hamster Chinês).

Efeitos genotóxicos e mutagênicos em materiais endodônticos têm sido estudados (GEURTSEN e LEYHAUSEN, 1997). O teste de micronúcleo (MNT) *in vitro* é um ensaio utilizado para análise da genotoxicidade de materiais ou componentes e é capaz de detectar aberrações ou mutações cromossômicas além de detectar clastogenes e aneugenes, porque fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular normal (SCHWEIKL e SCHMALZ⁸⁶, 2000).

Schweikl e Schmalz⁸⁶ (2000) utilizaram o teste de MNT para analisar a indução de micronúcleos em células V79 pelos componentes do cimento endodôntico AH Plus. Os resultados mostraram que o número de micronúcleos foi sete vezes maior nas culturas tratadas com AH Plus comparado ao grupo controle. Os autores relatam que o AH Plus é capaz de induzir mutações cromossômicas nestas condições experimentais e, portanto, é um material com potencial genotóxico.

O teste MNT também foi utilizado para mensuração da genotoxicidade de resinas compostas (Solitaire, Solitaire 2, Tetric Ceram, Dyract AP, Definite) testadas em células V79. A resina Solitaire foi a mais tóxica e causou aumento de dez vezes no número de micronúcleos em relação ao grupo controle. Os achados deste estudo sugerem que componentes mutagênicos das resinas compostas deveriam ser substituídos por materiais mais biocompatíveis para evitar fatores de risco para a saúde de pacientes e profissionais (SCHWEIKL et al.⁸⁸, 2005).

A formação de micronúcleos e a indução de mutações genéticas pelo teste MNT foram avaliadas em células de mamíferos tratadas com oxiranes e siloranes. Oxiranes e siloranes são moléculas utilizadas no desenvolvimento de resinas compostas com baixa contração de polimerização. Uma vez que algumas destas moléculas são altamente reativas, elas poderiam conduzir a efeitos biológicos adversos nos mecanismos genéticos. As oxiranes induziram um número de micronúcleos cinco vezes mais alto que o grupo controle e as siloranes

causaram efeitos mais leves na indução de mutações genéticas. Os resultados indicam potencial mutagênico baixo para as siloranes, enquanto, algumas oxiranes induziram efeitos severos na genética celular (SCHWEIKL et al.⁸⁷, 2004).

2.6 Ciclo celular

O ciclo celular tem quatro fases: G1 (Gap 1), S (Síntese), G2 (Gap 2) e M (Mitose). Durante a interfase (G1, S, G2) as células duplicam sua massa e no final da fase S, o processo de replicação do DNA resulta em quatro cópias de cada cromossomo por célula. Abaixo de certas condições tais como falta de nutrientes ou dano químico, as células não realizam o ciclo celular e ficam em uma fase de latência chamada G0. Entretanto, quando ocorre um estímulo citotóxico severo, as células podem também não realizar o ciclo celular e ativar um processo de morte celular programada, também chamada apoptose (SILVA et al.⁹³, 2003).

Alguns agentes genotóxicos são capazes de provocar dano ao DNA o que causa um atraso no ciclo celular para que a célula seja capaz de realizar o reparo do DNA antes da progressão do ciclo celular (SCHWEIKL et al.⁸⁹, 2005). Assim, a análise do ciclo celular pode ser realizada para determinação da proliferação celular e das células em apoptose *in vitro* após a exposição a um material. Este método consiste no manchamento das células pelo corante iodeto de propídio seguido pela mensuração em citometria de fluxo (FACS) (SILVA et al.⁹³, 2003).

O TEGDMA é um monômero presente nas resinas compostas que causa efeitos mutagênicos em células eucarióticas, provavelmente como consequência do dano do DNA. Para estudar os efeitos do TEGDMA em várias fases do ciclo celular, Schweikl et al.⁸⁹ (2005) utilizaram três linhagens celulares: células V79, fibroblastos

humanos da pele e fibroblastos humanos primários da polpa as quais foram expostas a concentrações crescentes de TEGDMA (0–3 mmol/l). A sobrevivência e viabilidade celular foram determinadas após 24 h e 48 h e a distribuição das células entre as fases do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo (FACS). A maioria das células V79 tratadas com TEGDMA se acumulou na fase G2. Em contraste, 30% dos fibroblastos de pele foram bloqueados reversivelmente na fase G1 por 0,5-3,0 mmol/l TEGDMA. A porcentagem de células humanas pulpares na fase G1 aumentou lentamente com 1 mmol/l TEGDMA, mas o número das células reduziu para 10–20% com 1,5-3,0 mmol/l TEGDMA. A porcentagem das células pulpares aumentou na fase G2 após 48 h. De acordo com estes resultados, conclui-se que o TEGDMA pode influenciar nos processos fisiológicos como crescimento e diferenciação celular sobre células humanas pulpares *in vivo*.

Além de causar dano ao DNA celular, os monômeros de resinas compostas, como TEGDMA e HEMA são capazes de causar um desequilíbrio no estado redox de células eucarióticas. Os efeitos do TEGDMA e HEMA no ciclo celular normal foram analisados por Schweikl et al.⁹¹, em 2007, por citometria de fluxo na presença de antioxidante acetilcisteína (NAC) para ROS. Em adição a formação de micronúcleo foi analisada em células V79 na presença de NAC. Houve atraso no ciclo celular na fase G2 pelo TEGDMA e HEMA, entretanto na presença de NAC ocorreu reversão este atraso nas células. O número de micronúcleos foi aumentado consideravelmente nas células V79 pelo TEGDMA e HEMA, indicando a genotoxicidade de ambos os materiais. Entretanto, a formação de micronúcleos foi diminuída na presença de NAC, indicando seu papel protetor. Os resultados sugerem que os efeitos genotóxicos causados pelo TEGDMA e HEMA são mediados, pelo menos em parte, pelo estresse oxidativo.

O estudo do ciclo celular de células eucarióticas em materiais dentários ainda é escasso. Moghaddame-Jafari, et al.⁵⁸, em

2005, avaliaram os efeitos do MTA branco (ProRoot) sobre duas linhagens celulares pela análise da apoptose e ciclo celular. Células *odontoblasto-like* de ratos (MDPC-23) e células pulparens indiferenciadas (OD-21) foram expostas a concentrações de 0 a 100 mg de MTA por 24 h. O manchamento por iodeto de propídio seguido pela análise em citometria de fluxo demonstrou que o MTA não induziu apoptose em ambas as linhagens celulares. A análise do ciclo celular mostrou que o MTA induziu um modesto aumento na porcentagem de MDPC-23 nas fases S e G2 do ciclo celular e em OD-21 na fase S, quando comparado ao grupo controle. O MTA promoveu proliferação e não induziu apoptose em células pulparens *in vitro*. Estes achados sugerem um mecanismo para explicar o efeito regenerativo observado no complexo dentino-pulpar quando o MTA é utilizado como material de proteção pulpar direta.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar *in vitro*, em nível molecular, os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de materiais endodônticos sobre cultura de células pulpares humanas transformadas (tHPC) e fibroblastos V79.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparação dos extratos originais

Neste estudo foram utilizados quatro materiais: Cimento de hidróxido de cálcio (HC) (Hydro C, Dentsply, Brasil); Agregado trióxido mineral agregado cinza (MTA, Angelus, Brasil); Agregado trióxido mineral branco (MTA, Angelus, Brasil); Polímero derivado do óleo da mamona (POM) (Poliquil, Araraquara, SP, Brasil). O cimento de ionômero de vidro modificado por resina Vitrebond (3M ESPE, Dental Products, USA) foi utilizado como controle positivo para o teste de citotoxicidade e de produção de ROS.

Os materiais foram preparados sobre discos de Teflon medindo 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura (IBG Monforts, Germany). Os cimentos foram manipulados de acordo com a recomendação dos fabricantes. Os espécimes do cimento Vitrebond foram polimerizados (780mW/cm^2) por 40 s em cada lado (Figura 1).

Em seguida, os espécimes de cada material foram colocados sobre filtros de 30 mm de diâmetro com poros de tamanho $0,4\ \mu\text{m}$ (Milipore, Best. Nr.) e o conjunto foi colocado dentro de placas de 6 poços (Costar, Corning Incorporated) (Figura 2). Cada poço foi preenchido com 3 ml de meio de cultura que variava de acordo com o tipo de célula utilizado. As placas permaneceram em estufa com 5% CO_2 a 37°C por 24h (Figura 3). Após este período, o meio foi removido do contato com os espécimes formando os extratos originais (1:1) de cada material.

Os extratos originais (1:1) foram preparados seguindo as recomendações da ISO⁴³ 10993 em uma proporção de 91,6 mm² da área da superfície do espécime por ml de meio de cultura.

Após 24 h, os extratos originais foram diluídos serialmente em meio de cultura específico par cada linhagem celular, antes da realização dos testes de citotoxicidade, indução de micronúcleo, produção de ROS e análise do ciclo celular.



FIGURA 1 - Polimerização dos espécimes do cimento Vitrebond por 40 s em cada lado.



FIGURA 2 - Espécimes de cada material sobre filtros dentro de poços.



FIGURA 3 - Filtros preenchidos com 3 ml de meio de cultura.

4.2 Teste de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade foram utilizados os seguintes materiais: Cimento de hidróxido de cálcio (HC); MTA cinza; MTA branco e Polímero derivado do óleo da mamona (POM). O Vitrebond foi utilizado como material de controle positivo. Foram confeccionados 7 espécimes formando 3 ml dos extratos originais (1:1) de cada material.

Células pulpares humanas transformadas (tHPC) entre as passagens 25 a 35 foram cultivadas em MEM α (Gibco BRL, Karlsruhe, Germany) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml) e geneticina (50 mg/ml) a 37°C e 5% CO₂ como descrito por Galler et al.³³ (2006). Após dois subcultivos, as células foram lavadas com 4 ml de PBS, separadas com 3 ml de accutase (PAA Laboratório GmbH, Germany), ressuspendidas em 10 ml de meio de cultura e transferidas para um tubo de Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) formando uma suspensão celular.

A suspensão celular foi contada com o uso de uma câmara de Neubauer® (Kerka, Germany) e a quantidade de 8×10^3 células foi colocada em cada poço de placas de 96 poços e incubadas por 24h a 37°C (Figura 4). Após este período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas a 200 μ l de diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) dos extratos originais (1:1) dos materiais e 200 μ l de meio de cultura para o controle negativo (sem células) e 200 μ l de meio para o controle positivo (com células) e incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24 h (Figuras 5 e 6). Após acrescentar as diluições dos extratos originais sobre a cultura celular, foi realizada a mensuração do pH do restante das soluções para que não houvesse nenhuma influência do pH na citotoxicidade dos materiais testados. Para isto, foi utilizado um pHmetro (Calimatic®, Knick, Germany) e esta mensuração foi realizada em triplicata.

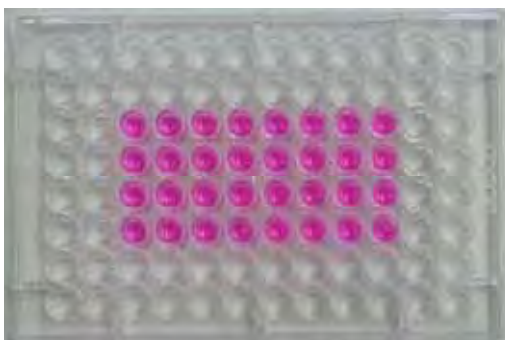


FIGURA 4 - Placa de 96 poços contendo 8×10^3 células em cada poço.

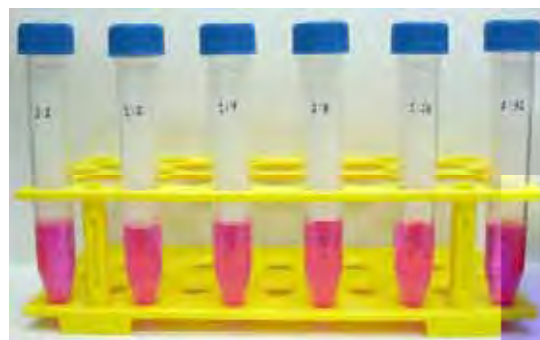


FIGURA 5 – Extrato original (1:1) e diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) em meio de cultura dos materiais.

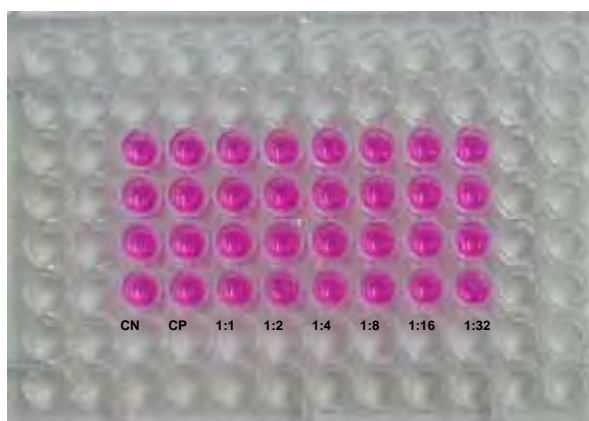


FIGURA 6 – Placa de 96 poços para um material, em que foram colocados 200 μ l de meio de cultura em cada poço dos controles negativo (CN) e positivo (CP) e 200 μ l do extrato original e das diluições do material em cada poço.

A sobrevivência celular foi determinada pelo ensaio de cristal violeta (GILLIES et al.³⁴, 1986). As culturas celulares foram fixadas com 150 μ l de glutaraldeído (1% em água destilada) por 30 minutos, lavadas duas vezes com 200 μ l de PBS e coradas com 150 μ l de cristal violeta (0,02% em água destilada, Gibco, Karlsruhe, Germany) por 15

minutos. Após este período, as culturas celulares foram lavadas com água corrente até que todo o corante fosse removido, o remanescente de água foi removido, e quando as placas estavam completamente secas foi acrescentado 180 µl de álcool 70% para dissolver o corante (Figura 7). As densidades ópticas foram mensuradas em um espectrofotômetro (Infinite F200, TECAN, Crailsheim, Germany) com comprimento de onda ajustado em 600 nm (Figura 8). As culturas celulares foram expostas a diluições seriais (pelo menos 5 diluições até 1:32) dos extratos originais dos materiais em quatro experimentos independentes.

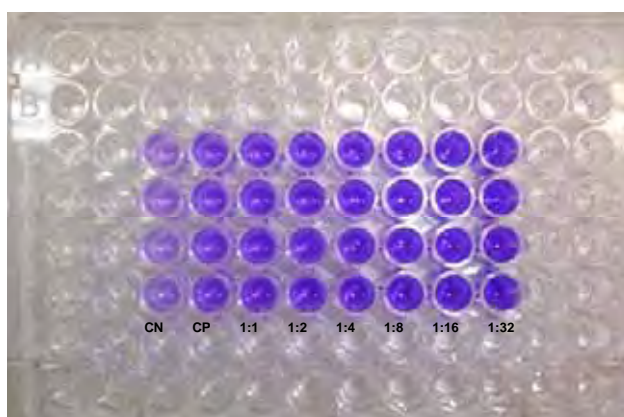


FIGURA 7 – Placa de 96 poços com células coradas pelo corante cristal violeta (CN –controle negativo; CP – controle positivo).



FIGURA 8 – Espectrofotômetro com placa de 96 poços para a realização da mensuração da densidade celular.

As densidades ópticas obtidas pela leitura no espectrofotômetro foram comparadas às culturas do controle positivo (=100%), e as diferenças entre os valores das medianas foram estatisticamente analisados utilizando o teste de U-Mann–Whitney ($\alpha=0,05$) (SPSS, Versão 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

4.3 Mensuração dos níveis de espécie reativos de oxigênio (ROS)

A liberação de ROS em cultura de células foi quantificada utilizando uma sonda fluorescente sensível à oxidação ($H_2DCF-DA$, Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Germany), como previamente descrito por Spagnuolo et al.¹⁰⁰ (2006). Os resultados advêm da atividade intracelular na formação do 2,7- diclorodihidrofluoresceína (DCFH), um composto não fluorescente o qual emite fluorescência quando é oxidado para 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA).

Para este teste foram utilizados os seguintes materiais: Cimento de hidróxido de cálcio (HC); MTA cinza; MTA branco e Polímero derivado do óleo da mamona (POM). Vitrebond e TEGDMA (monômero trietilenoglicol dimetacrilato, Sigma Aldrich, Germany) foram utilizados como controles positivos. Foram confeccionados 14 espécimes formando 6 ml dos extratos originais (1:1) de cada material.

Células pulpares humanas transformadas (tHPC) foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

A suspensão celular foi contada com o uso de uma câmara de Neubauer® (Kerka, Germany) e as tHPC foram colocadas dentro de placas com 6 poços (2×10^5 células por poço) e incubadas por 24 h em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$ (Figura 9). Após este período, o

meio antigo foi removido e as células foram expostas a 2 ml dos extratos originais (1:1) e 2 ml das diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) (Figuras 10 e 11). Além disso, as células foram expostas a 2 ml de meio de cultura (controle negativo) e 2 ml de cada concentração de TEGDMA (1,5 e 3 mmol/l) (controle positivo). Após a aplicação das diluições, as células foram pré-incubadas por 30 minutos em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foi acrescentado 2 µl de DCFH em cada poço e as células foram incubadas por mais 30 min.



FIGURA 9- Placa de 6 poços contendo 2×10^5 células em cada poço.

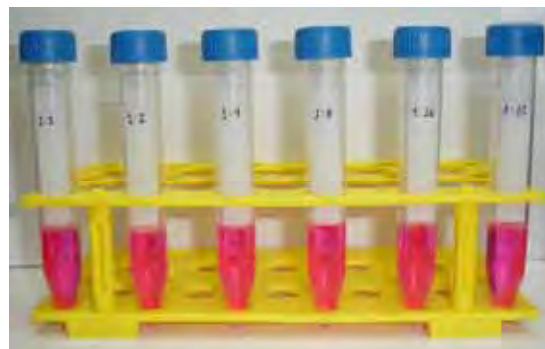


FIGURA 10 - Extrato original (1:1) e diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) em meio de cultura dos materiais.

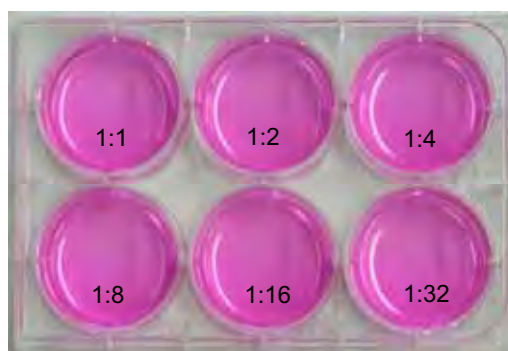


FIGURA 11 – Placa de 6 poços para um material, em que foram colocados 2 ml do extrato original e das diluições do material em cada poço.

Em seguida, as células foram lavadas com 1 ml de PBS, separadas com 0,5 ml de accutase (PAA Laboratório GmbH, Germany), ressuspensas em 1,5 ml de meio de cultura e centrifugadas (600 rpm, 5 min, Hettich, Germany). O *pellet* celular foi lavado e centrifugado duas vezes com PBS e ressuspendido em 250 μ l de PBS (Figura 12). Imediatamente após a ressuspensão, a fluorescência do DCF-DA foi determinada por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSCanto, Heidelberg, Germany) (Figura 13) com excitação do comprimento de onda de 495 nm e emissão do comprimento de onda de 530 nm (FL-1). A média da intensidade de fluorescência foi obtida por um histograma estatístico utilizando o programa BD FACS Diva.



FIGURA 12 - Células ressuspensas em 250 μ l de PBS.



FIGURA 13- Aparelho utilizado na análise da citometria de fluxo (BD FACSCanto).

Pelo menos quatro experimentos independentes foram realizados para cada material. As médias das intensidades fluorescentes foram comparadas ao grupo controle negativo (fator de fluorescência = 1,0) e as diferenças entre os valores médios foram estatisticamente analisadas utilizando o teste de U-Mann–Whitney ($\alpha=0,05$) (SPSS, Versão 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

4.4 Teste de micronúcleo (MNT)

Para o teste de micronúcleo, foram utilizados os seguintes materiais: Cimento de hidróxido de cálcio (HC); MTA cinza e Polímero derivado do óleo da mamona (POM). Vitrebond e Etilmetano sulfonato (EMS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram utilizados como controles positivos. Foram confeccionados 21 espécimes formando 9 ml dos extratos originais (1:1) de cada material.

Fibroblastos de hamster chinês (V79) entre as passagens 5 a 10 foram cultivados em MEM (Gibco BRL, Karlsruhe, Germany) suplementado com 5% SBF e com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) a 37°C e 5% CO₂.

As células foram primeiramente, descongeladas e subsequente subcultivadas três vezes antes da realização do experimento. As células foram lavadas com 5 ml de PBS-EDTA, separadas com 3 ml de tripsina, ressuspensas em 10 ml de meio de cultura e transferidas para um tubo de Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) formando uma suspensão celular.

A suspensão celular foi contada com o uso de uma câmara de Neubauer® (Kerka, Germany) e colocadas em lâminas de vidro estéreis as quais foram previamente colocadas dentro de placas com 4 poços, com densidade de 3×10^5 células por poço e 4 ml de meio de cultura (Figura 14). As placas foram deixadas por 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂.



FIGURA 14 – Células colocadas em lâminas de vidro estéreis dentro de placas com 4 poços e 4 ml de meio de cultura.

Após 24h, as células foram tratadas com 4 ml das diluições seriadas obtidas a partir dos extratos originais (1:1). Para o HC foram utilizadas as diluições 1:8 e 1:16 e para o MTA cinza e POM foram utilizadas os extratos originais (1:1) e a diluição 1:2. Para o Vitrebond (controle positivo) foram utilizadas as diluições 1:16 e 1:32. O grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura e o grupo controle positivo foi tratado com EMS na concentração de 5 mM (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamento das culturas celulares com diluições selecionadas para cada material e grupos controles.

Materiais	Diluições	
Controle negativo	Meio de cultura	
Controle positivo (EMS)	5 mM	
Controle positivo (Vitrebond)	1:16	1:32
HC	1:8	1:16
MTA cinza	1:1	1:2
POM	1:1	1:2

Após incubação por 24 h a 37°C, as soluções foram removidas dos poços e as lâminas foram lavadas com 3 ml de PBS e em seguida colocou-se 4 ml de álcool absoluto (100%) por 30 minutos para a fixação das células nas lâminas. Após este período, as lâminas foram

removidas dos poços e deixadas em temperatura ambiente para a secagem por 24 h.

As lâminas foram colocadas em uma caixa de vidro para a coloração das células. Para isso, as lâminas foram colocadas em uma solução de 5N HCl por 40 min, lavadas em água destilada e colocadas em corante SCHIFF (Sigma, Germany) por 30 min. Após este período, as lâminas foram lavadas em água sulfurada (208 ml de água destilada, 10 ml de 10% $K_2S_2O_5$ e 2 ml de 5N HCl) por 6 min. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 min e colocadas em diluições seriadas de alcoóis (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) por 5 min em cada. As lâminas, então, foram deixadas por 10 min em xylol e colocadas lamínulas com Entellan (Merck, Germany). Os micronúcleos foram analisados em microscópio com objetiva de imersão (100X) (Leica Leitz, Germany) em 1000 células/lâmina para cada diluição em experimentos independentes.

Pelo menos quatro lâminas derivadas de dois experimentos independentes foram analisadas, e a diferença entre os valores medianos foram estatisticamente analisados utilizando o teste de U-Mann–Whitney ($\alpha=0,05$) (SPSS, Versão 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

4.5 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular de células V79, foram utilizados os seguintes materiais: Cimento de hidróxido de cálcio (HC); MTA cinza e Polímero derivado do óleo da mamona (POM). O TEGDMA (Sigma Aldrich, Germany) foi utilizado como controle positivo.

Para o MTA cinza e POM foram confeccionados 56 espécimes formando 24 ml dos extratos originais (1:1) de cada material. Para o HC foram confeccionados 35 espécimes formando 15 ml do extrato original (1:1) deste material.

Fibroblastos de hamster chinês (V79) foram cultivados em MEM (Gibco BRL, Karlsruhe, Germany) suplementado com 5% FBS e com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) a 37°C e 5% CO₂. As células V79 foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

A suspensão celular foi contada com o uso de uma câmara de Neubauer® (Kerka, Germany) e as células V79 foram incubadas com uma densidade inicial de $2,5 \times 10^5$ por placa de cultura celular (145 mm de diâmetro) por 24 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 15). A monocamada de subconfluência das culturas de células foi exposta ao extrato original (1:1) e à diluição 1:2 do POM e MTA cinza, às diluições 1:8 e 1:16 do HC e à concentração 1,5 mmol/l do TEGDMA (Sigma-Aldrich, Germany) por 24h (2 placas/concentração) (Tabela 2).

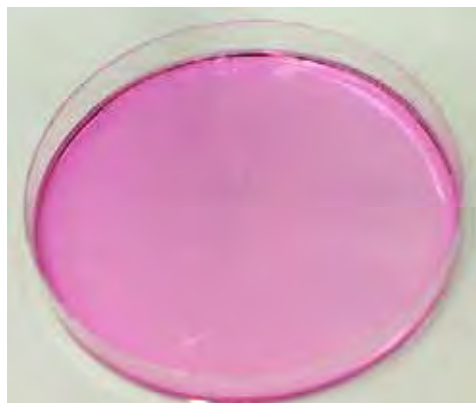


FIGURA 15 – Placas de cultura celular (145 mm de diâmetro) contendo $2,5 \times 10^5$ células.

Tabela 2 - Tratamento das culturas celulares com diluições selecionadas para cada material e grupos controles.

Materiais	Diluições	
Controle negativo	Meio de cultura	
Controle positivo (TEGDMA)	1,5 mmol/l	
HC	1:8	1:16
MTA cinza	1:1	1:2
POM	1:1	1:2

Após a exposição aos extratos e diluições, as células das placas foram lavadas duas vezes com PBS-EDTA, separadas utilizando tripsina e ressuspensas em meio de cultura. Em seguida, alíquotas de 1×10^6 células foram colocadas em tubos Eppendorf para a análise do conteúdo de DNA (distribuição das células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular) nas culturas celulares controle (não-tratadas) e tratadas (Figura 16A).

Assim, as células (1×10^6) foram lavadas duas vezes em PBS-BSA 2% (Figura 16B), e estocadas em refrigerador por pelo menos 24 h em 1 ml de metanol 70% (Figura 16C). O metanol foi então removido após centrifugação, e o *pellet* foi lavado duas vezes com PBS-BSA 2%. Subseqüentemente, o *pellet* foi ressuspensado em 425 μ l de PBS-BSA 2%, e foi adicionado 50 μ l de RNAase (1 mg/mL) e deixado por 30 minutos a 37°C. Finalmente, foram adicionados 25 μ l de iodeto de propídio (PI, MBL Medical e Biological Lab) por 5 minutos (Figura 17) e a suspensão celular foi analisada por citometria de fluxo (FACSCanto, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) (Figura 18).



FIGURA 16 – A- 1×10^6 células em 1 ml meio de cultura celular; B- Células em 1 ml de PBS/2% BSA; C –Células em 1 ml de metanol 70%.



FIGURA 17 – Células em 425 μ l de PBS-BSA 2% e 25 μ l de iodeto de potássio.



FIGURA 18 – Mensuração das amostras pelo FACS.

4.5.1 Citometria de fluxo

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto) equipado com laser de argônio, 15 mW, 488 nm. A fluorescência (FL-3) do PI foi mensurada por meio da passagem por um filtro (670 nm). A viabilidade das células foi avaliada por captação

imediate de 1 ml de PI (1 mg/ml) dentro de células não-fixadas após exposição, e subsequente análise de citometria de fluxo baseada em um perfil de fluorescência FSC-A. Para análise do conteúdo de DNA (análise do ciclo celular), sinais de fluorescência foram amplificados linearmente (FL-3). Vinte mil eventos para cada amostra foram coletados para caracterização do metabolismo e morfologia celular, por meio do programa BD FACS Diva e os dados estocados como uma lista de arquivos. Sinais de PI para análise do conteúdo de DNA foram submetidos a um processo de pulso para auxiliar o bloqueio da passagem de restos celulares. As porcentagens de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular foram calculadas pelo modelo matemático de histogramas utilizando o software Multicycle para Windows (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Pelo menos quatro experimentos independentes foram realizados.

Análises estatísticas da diferença entre a sobrevivência celular e conteúdo de DNA (distribuição das fases G1, S e G2) em culturas de células tratadas e não-tratadas foram realizadas utilizando o teste de U-Mann–Whitney ($\alpha=0,05$) (SPSS, Versão 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Citotoxicidade

Os resultados da citotoxicidade estão descritos na Figura 19 e Tabelas 3, 4 e 5. As porcentagens de células viáveis de todos os materiais comparados ao grupo controle são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre tHPC, expressado em porcentagem de células viáveis. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil.

Materiais	Diluições						
	Controle	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
POM	100.0 (94.4-103.6)	100.0 (92.2-105.0)	96.2 (94.1-106.1)	99.5 (97.5-106.4)	103.6 (98.7-107.6)	104.1 (102.7-108.3)	105.2 (100.7-109.3)
Hydro C	100.0 (97.9 -103.3)	102.8 (97.1-111.1)	95.9 (91.7-99.7)	85.7 (82.0-90.1)	58.8 (44.0-67.0)	9.8 (5.8-27.3)	20.5 (14.5-21.9)
MTA cinza	100.0 (98.1-101.5)	95.5 (90.8-118.0)	97.6 (88.7-111.3)	92.8 (86.1-108.5)	87.1 (83.8-105.3)	85.0 (76.4-106.8)	82.5 (77.3-108.3)
MTA branco	100.0 (97.9 -102.4)	99.3 (96.1-104.5)	95.0 (91.0-102.1)	95.7 (91.3 -98.6)	90.5 (85.5- 95.8)	91.3 (83.9 -94.0)	89.0 (83.4 -96.3)
Vitrebond	100.0 (95.2 -102.8)	79.5 (73.8-82.6)	76.8 (61.2-78.7)	70.6 (55.0-78.3)	54.9 (39.0-62.7)	32.6 (15.6-42.8)	24.2 (19.4-35.4)

% Sobrevivência celular: Mediana (25-75% percentil)

Após 24 h de exposição, o extrato original (1:1) do HC e a diluição 1:2 reduziram a taxa de sobrevivência celular para 20,5% e 9,8%, respectivamente, apresentando significância estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Tabela 4). As diluições 1:4 e 1:8 deste material também foram estatisticamente significantes em relação

ao grupo controle (Tabela 4). Verificou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa deste material em relação ao MTA branco, MTA cinza e o POM nas diluições 1:1 até 1:8 ($p \leq 0,05$) (Tabela 5).

O extrato original (1:1) e as diluições 1:2 e 1:4 do MTA cinza apresentaram pequena diminuição na sobrevivência celular, mas significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Tabela 4). Em relação aos materiais testados, este material apresentou diferença estatisticamente significativa ao HC (1:1 a 1:8) e ao POM (1:1, 1:2 e 1:4) (Tabela 5).

O cimento MTA branco exibiu alta sobrevivência celular semelhante ao grupo controle (Figura 19), sendo que o extrato original e as diluições deste cimento não apresentaram significância estatística em relação ao grupo controle (Tabela 4). Em relação aos materiais testados, este material apresentou diferença estatisticamente significativa ao HC (1:1 a 1:8) e ao POM (1:1, 1:2 e 1:4) (Tabela 5). Verificou-se também que a sobrevivência celular no MTA branco não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao MTA cinza em todas as diluições ($p \geq 0,05$) (Tabela 5).

Como ilustrado na Figura 19, efeitos similares sobre a taxa de sobrevivência celular foram observados após o tratamento de culturas de células pulpares humanas transformadas (tHPC) com extrato original (1:1) e diluição 1:2 do POM. Na presença deste extrato, a proliferação celular foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Tabela 4). Verificou-se que o extrato original do POM aumentou a taxa de sobrevivência celular em 105,2% e a diluição 1:2 aumentou para 104,1% (Tabela 4). Este material apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos MTA cinza e branco nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4 ($p \leq 0,05$) (Tabela 5).

Vitrebond foi o material mais citotóxico testado aqui, uma vez que causou uma diminuição acentuada na taxa de

sobrevivência celular em todas as diluições, sendo estatisticamente significativa em relação a todos os materiais experimentais ($p \leq 0,01$) (Tabela 5).

Resumindo os resultados do teste do cristal violeta, a toxicidade dos materiais pode ser classificada seguindo a ordem do material mais tóxico para o menos tóxico: Vitrebond > HC >> MTA cinza = MTA branco >>> POM.

Os valores de pH dos extratos originais variaram sempre entre 7,0 e 7,8, portanto não foi observado nenhuma indução do pH na citotoxicidade dos materiais testados.

Tabela 4 – Valores de p dos materiais testados em relação ao grupo controle.

Materiais	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
POM	0,024*	0,033*	ns	ns	ns	ns
Hydro C	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	ns	ns
MTA cinza	0,001*	0,001*	0,008*	ns	ns	ns
MTA branco	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Vitrebond	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$); ns = não significante.

Tabela 5 - Mann-Whitney *U*-teste (5%) para as diluições de todos os materiais.

Materiais	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Vitrebond	A	A	A	A	A	A
Hydro C	B	B	A	B	B	B
MTA cinza	C	C	C	C	B	B
MTA branco	C	C	C	C	B	B
POM	D	D	D	C	B	B

* Diferentes letras correspondem à diferença estatisticamente significante.

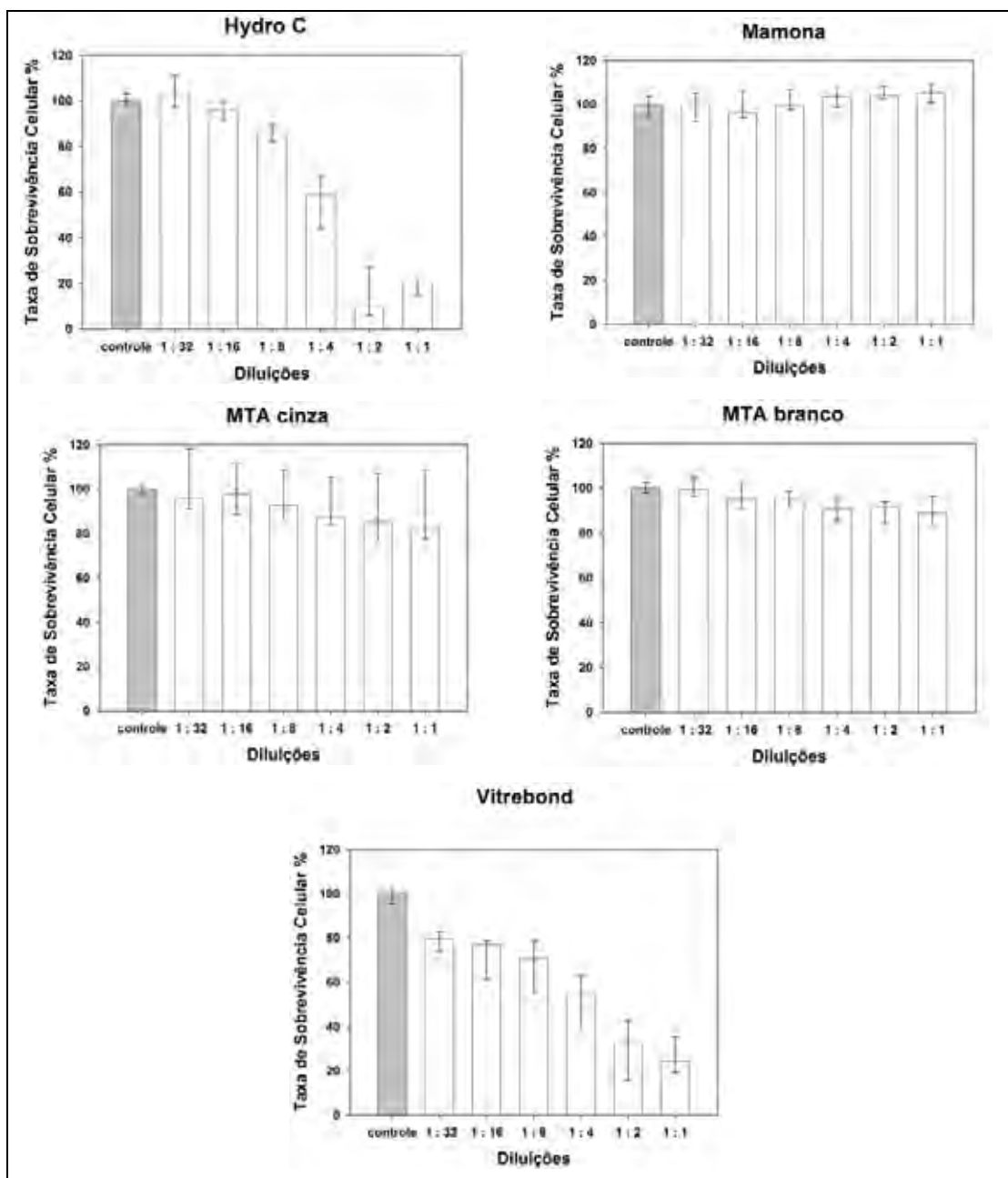


FIGURA 19 - Citotoxicidade dos materiais em tHPC após a exposição às diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As células pulpares humanas transformadas foram expostas por 24 h, e a taxa de sobrevivência celular foi observada em quatro experimentos independentes (valores de medianas: 25-75% percentil).

5.2 Mensuração dos níveis de espécie reativos de oxigênio (ROS)

A geração da fluorescência, a qual é indicativa na produção de ROS em células pulpares humanas transformadas, foi determinada após 1 h de exposição aos materiais testados.

As médias das intensidades de fluorescência foram obtidas por histogramas estatísticos utilizando o programa BD FACS Diva, e estas médias foram padronizadas de acordo com o grupo controle negativo (fator de fluorescência = 1,0). O TEGDMA foi utilizado como referência nas concentrações de 1,5 mmol/l e 3 mmol/l e estas foram capazes de aumentar a quantidade de ROS em 2,5 e 4 vezes, respectivamente (Figura 20).

O HC apresentou pequena liberação de ROS nas diluições maiores, entretanto, sem significância estatística em relação ao grupo controle negativo (Figura 20). Os grupos do MTA cinza, MTA branco e POM não apresentaram significância estatística no aumento de níveis de ROS em nenhuma das diluições testadas em relação ao grupo controle negativo ($p \leq 0,05$). Verificou-se que a produção de ROS nestes materiais apresentou um padrão linear (Figura 20).

O extrato original do Vitrebond (1:1) foi capaz de aumentar os níveis de ROS em até 7 vezes quando comparado ao grupo controle negativo, sendo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). De acordo com o gráfico do Vitrebond apresentado na Figura 20, observou-se que à medida que as diluições aumentaram, os níveis de ROS diminuíram.

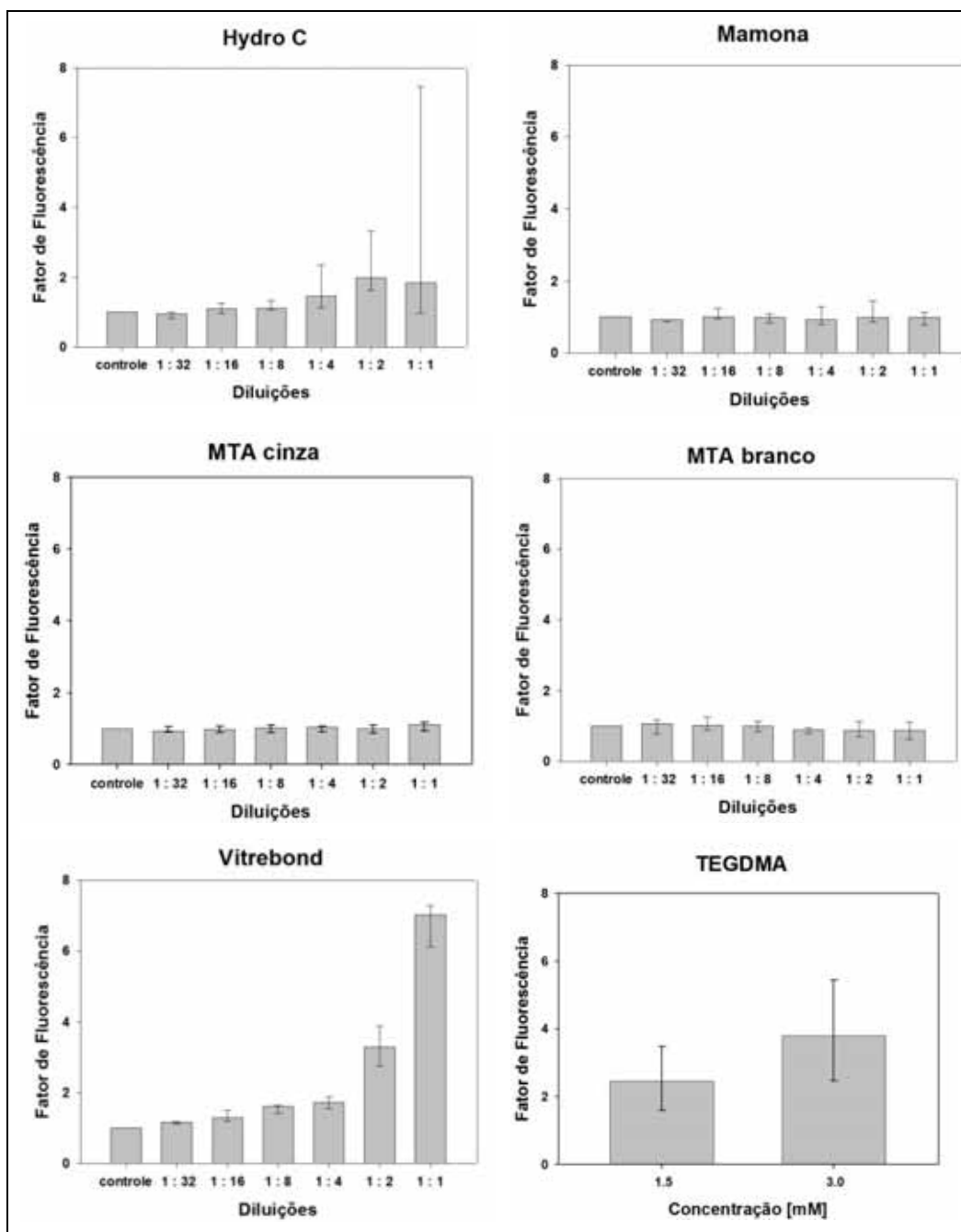


FIGURA 20 – Geração de ROS em células tHPC após a exposição aos materiais testados. A produção de ROS foi mensurada utilizando uma sonda fluorescente sensível à oxidação ($H_2DCF-DA$). As culturas celulares foram expostas a diluições de materiais e a concentrações de 1,5 mmol/l e 3 mmol/l de TEGDMA. As barras representam as medianas (25-75% percentil) calculadas em histogramas individuais.

Os extratos originais dos materiais HC, MTA cinza, MTA branco e POM não apresentaram diferença estatisticamente nos níveis de ROS quando comparados uns aos outros (Tabela 6). Entretanto, estes materiais apresentaram baixos níveis de produção de ROS quando comparados ao extrato original do Vitrebond ($p \leq 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de p dos materiais testados indicando a significância estatística dos extratos originais (1:1) entre os materiais.

Materiais	POM	HC	MTA cinza	MTA branco	Vitrebond
HC	0,248	-	0,248	0,149	0,028*
MTA cinza	0,386	0,248	-	0,248	0,034*
MTA branco	0,564	0,149	0,248	-	0,034*
POM	-	0,248	0,386	0,564	0,034*
Vitrebond	0,034*	0,028*	0,034*	0,034*	-

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

5.3 Teste de micronúcleo (MNT)

A formação de micronúcleos pelos materiais endodônticos testados foi analisada em cultura de células V79. Os micronúcleos foram identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal e compreendendo menos de 1/3 da área do núcleo (Figura 22). Apenas

células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose e aquelas exibindo fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

Os materiais HC, MTA e POM não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo controle negativo ($p \geq 0,05$) (Figura 21 e Tabela 7).

Entretanto, o EMS, o qual foi utilizado como controle positivo, aumentou o número de micronúcleos em aproximadamente 7 vezes em relação ao grupo controle negativo. Verificou-se também que o Vitrebond na diluição 1:16 e 1:32 foi capaz de aumentar o número de micronúcleos em 2,5 vezes em relação ao grupo controle negativo ($p=0,004$) (Tabela 7). As diluições mais altas do HC e Vitrebond causaram acentuada citotoxicidade às células V79 e portanto não foi possível realizar a contagem de micronúcleos.

Tabela 7 – Média de micronúcleos em 1000 células e significância de todos os materiais em relação ao grupo controle negativo.

Materiais	Média de micronúcleos / 1000 células	p
Controle negativo	11,25	-
Vitrebond (1:16)	22,5	0,004*
Vitrebond (1:32)	15,75	0,004*
Hydro C (1:8)	11,5	0,808
Hydro C (1:16)	11	0,283
MTA cinza (1:1)	14	0,065
MTA cinza (1:2)	10	0,073
POM (1:1)	11,75	0,683
POM (1:2)	9,75	0,154
Controle positivo (EMS)	66,37	0,000*

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$)

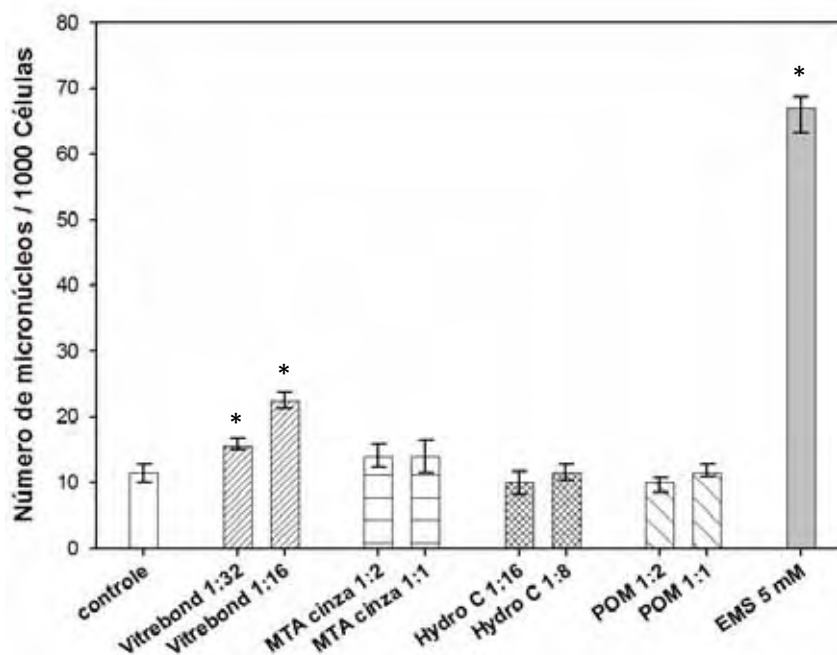


FIGURA 21 – Indução de micronúcleos em células V79 após a exposição aos materiais em diferentes diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As barras representam as medianas (25-75% percentil) e as medianas dos números de micronúcleos foram calculadas em relação ao grupo controle negativo. Diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle negativo e os grupos tratados são indicadas com asteriscos.

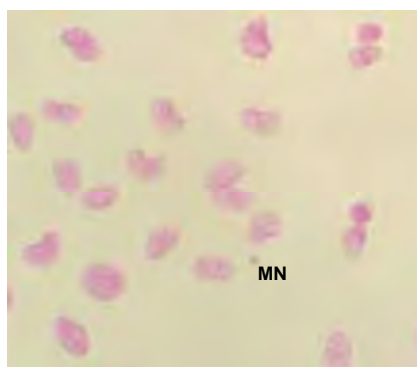


FIGURA 22 – Formação de micronúcleos em células V79 após o tratamento com Vitrebond (extrato original); MN – micronúcleo.

5.4 Análise do ciclo celular

Na Tabela 8 são observados os valores medianos da porcentagem de células encontradas nas fases G1, S e G2 do ciclo celular das células V79, no grupo controle negativo e após o tratamento com os materiais experimentais.

Tabela 8 – Porcentagem do número de células viáveis encontrado em cada fase do ciclo celular no grupo controle negativo e após o tratamento com os materiais. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil.

Materiais/Fases	G1	S	G2
Controle negativo	33,1% (32,7%-34,5%)	54,8% (53,5%-56,5%)	11,9% (10,4%-12,7%)
TEGDMA	20,3% (7,5%-24,1%)	38% (30,2%-39,7%)	46,3% (43,4%-52,9%)
MTA 1:1	31,3% (30,3%-35,2%)	49,2% (46,3%-52,9%)	17,7% (15,5%-21,9%)
MTA 1:2	32,8% (32,5%-33,3%)	52,2% (45,8%-54%)	14,9% (12,9%-21,7%)
Hydro C 1:8	38,1% (35,7%-39,7%)	43,8% (42%-45,2%)	18,3% (15,4%-21,9%)
Hydro C 1:16	38,5% (35%-39%)	47,2% (44%-49,5%)	14,9% (11,8%-20%)
POM 1:1	33% (32,5%-34,8%)	55,2% (49,9%-61,5%)	11,8% (3,7%-17,7%)
POM 1:2	34,2% (32,8%-35,8%)	52,9% (47,5%-53,9%)	12,8% (11,2%-18,9%)

No grupo controle negativo, verificou-se uma distribuição normal do número de células em cada fase do ciclo celular, sendo que 33% das células V79 foram encontradas na fase G1, 12% na fase G2. A relativamente alta porcentagem de células encontrada na

fase S (55%) indica uma alta taxa de proliferação desta linhagem celular (Figura 23).

A distribuição das células V79 entre as fases do ciclo celular em culturas celulares tratadas com TEGDMA 1,5 mmol/l foi maior na fase G2. Observou-se que mais de 45% das células V79 ficaram atrasadas na fase G2 e somente cerca de 20% foram encontradas na fase G1, indicando que o ciclo celular normal destas células foi modificado na presença do TEGDMA (Tabela 8 e Figura 23). O número de células das fases G1, S e G2 no TEGDMA foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo (Tabela 9).

As diluições do HC aumentaram levemente, mas significante, o número de células nas fases G1 e G2 (1:8) comparado ao grupo controle negativo. Estas mínimas mudanças foram associadas a uma pequena diminuição do número de células na fase S (Figura 23 e Tabela 9). O extrato original (1:1) do MTA causou um pequeno aumento no número de células na fase G2 relacionado à pequena diminuição da população celular na fase S (Figura 23 e Tabela 9).

Entretanto, as culturas tratadas com POM (1:1 e 1:2) não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de células em G1, S e G2 em relação ao grupo controle negativo ($p \geq 0,05$), mostrando que este material apresentou comportamento semelhante ao controle negativo (Figura 23 e Tabela 9).

Na análise da comparação entre os materiais, verificou-se que todos os materiais apresentaram significância estatística no número de células das fases G1, S e G2 em relação ao TEGDMA 1,5 mmol/l (controle positivo) ($p=0,014$) (Tabela 9).

Além disso, ao comparar as diluições dos materiais, observou-se que o número de células nas fases G1, S e G2 do MTA

cinza (1:1) não foi significativa em relação ao MTA cinza (1:2). Para o HC, também não houve diferença estatisticamente significativa entre suas diluições (1:8 e 1:16). O número de células das fases G1, S e G2 do POM não foi diferente significativamente entre o extrato original (1:1) e a diluição 1:2.

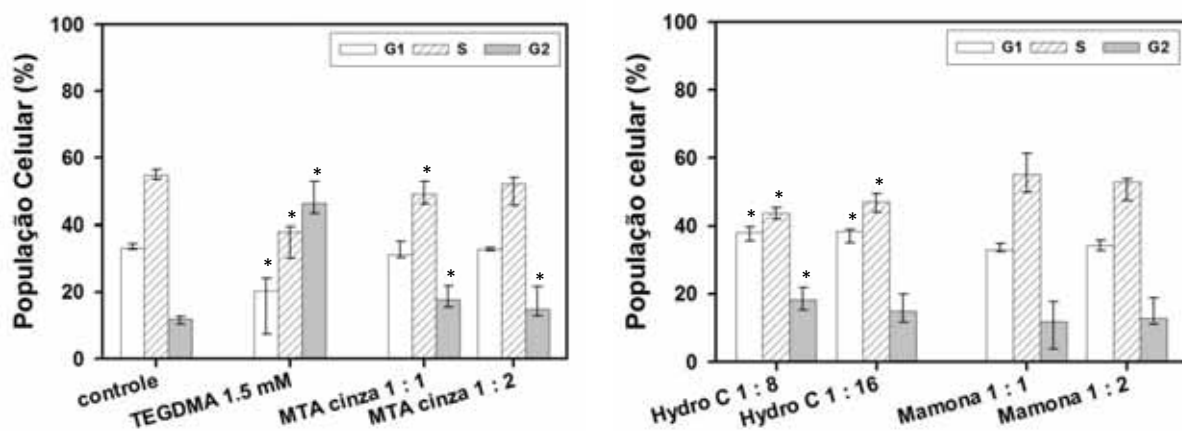


FIGURA 23 – Análise do ciclo celular de células V79 após a exposição ao TEGDMA, HC, MTA cinza e POM. As porcentagens dos números de células em cada fase foram calculadas em histogramas individuais em 4 experimentos independentes. As barras representam as medianas (25-75% percentil) e os asteriscos indicam significância estatisticamente significativa das populações celulares nas fases G1, S e G2 em relação ao grupo controle negativo.

Tabela 9 – Valores de p dos materiais testados, indicando a significância estatística em relação ao grupo controle negativo.

Materiais/Fases	G1	S	G2
TEGDMA 1,5mmol/l	0,009*	0,009*	0,009*
Hydro C 1:8	0,026*	0,014*	0,014*
Hydro C 1:16	0,026*	0,014*	0,142
MTA cinza 1:1	0,215	0,027*	0,014*
MTA cinza 1:2	0,453	0,086	0,027*
POM 1:1	0,621	0,624	0,902
POM 1:2	0,459	0,059	0,462

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da Metodologia

No presente estudo foram realizados quatro tipos de testes para analisar alguns aspectos do comportamento biológico de materiais endodônticos e para isso utilizou-se duas linhagens celulares. A citotoxicidade foi avaliada em células pulpares humanas transformadas (tHPC) por meio do teste de cristal violeta e pela quantificação da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por estas células após o contato com os materiais. Assim, foi possível analisar a resposta celular quanto aos sinais de transdução relacionados à produção de ROS e conseqüentemente a sobrevivência celular em relação a estas substâncias. A genotoxicidade foi analisada pela formação de micronúcleos durante a fase mitótica do ciclo de celular em fibroblastos de hamster Chinês (V79) para detecção de mutações cromossômicas. Além disso, a possível indução no atraso do ciclo celular pelos materiais foi avaliada por citometria de fluxo.

Na Literatura, existem algumas controvérsias sobre a utilização de células primárias, as quais derivam de um tecido alvo *in vivo*, ou de células permanentes em estudos de citotoxicidade (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001). Huang e Chang³⁹ (2002) acreditam que células primárias humanas da polpa dentária estão mais próximas ao tecido original e são facilmente identificadas. Além disso, relatam que as células primárias possuem um metabolismo relativamente estável em relação ao tecido original, o que aproxima o experimento *in vitro* da situação *in vivo*. As

células primárias humanas podem ser cultivadas com um baixo número de passagens o que minimiza as alterações genéticas celulares decorrentes da manipulação da cultura celular (KARIMJEE et al.⁴⁵, 2006).

Por outro lado, autores relatam que o acesso às células primárias é difícil e restrito devido a sua disponibilidade limitada, falta de padronização e mudanças no padrão de expressão de proteínas após um prolongado subcultivo. Em contrapartida, linhagens celulares permanentes são estáveis, apresentam características biológicas bem definidas e podem ser obtidas a partir de coleções de cultura celulares (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001; GALLER et al.³³, 2006).

Os fibroblastos são as células mais utilizadas para o estabelecimento de linhagens celulares permanentes, pois são células diplóides que tem tendência para se tornarem aneuplóides quando cultivadas por um longo período de tempo, originando assim culturas contínuas (CASTRO-SILVA¹⁸, 2004). Além disso, estas células têm capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares, sendo, portanto utilizadas em estudos de citotoxicidade de diversos compostos (FRESHNEY³⁰, 2000). No presente estudo, foi utilizada uma linhagem permanente de células de fibroblastos da polpa humana a qual foi previamente estabelecida por Galler et al.³³ (2006).

As células primárias em cultura têm uma capacidade limitada de divisão e logo alcançam um estado não proliferativo chamado senescência. Senescência é caracterizada pela reduzida proliferação celular, pelo crescimento do citoplasma e finalmente pela morte celular (THONEMANN e SCHMALZ¹⁰⁴, 2000). Este estado de senescência limita a investigação das células derivadas da polpa humana quanto ao metabolismo celular, regulação de genes, mecanismo de formação de dentina, ou resposta a exposição de materiais. Para minimizar este problema, células primárias derivadas da polpa humana têm sido estabelecidas e transformadas com um plasmídeo contendo seqüências

codificadas do vírus Simian 40 (SV40 T-Ag) (THONEMANN e SCHMALZ¹⁰⁴, 2000; GALLER et al.³³, 2006).

A transformação de fibroblastos pulpare humanos com oncogenes virais, tais como vírus Simian 40 (SV40 T-Ag), permite às células primárias estender seu tempo de vida e retardar a senescência. O vírus SV40 T-Ag induz o processo de imortalização das células em duas fases. Na primeira fase, as células mostram um período contínuo de crescimento celular, sendo resultado da capacidade do vírus SV40 T-Ag para superar a senescência, mas ainda não suficiente para imortalização destas células. Na segunda fase, uma grande quantidade de células morre provavelmente devido à alta instabilidade cromossomal. Além disso, com cada subcultura sucessiva, a parte da população com capacidade para proliferar mais depressa irá predominar gradualmente, enquanto que as células com menor capacidade proliferativa irão desaparecendo (FRESHNEY³⁰, 2000). Finalmente, surgem populações clonais advindas das células e estas células são capazes de realizar crescimento infinito por terem adquirido um fenótipo estável (GALLER et al.³³, 2006).

Assim, a transformação das células pulpare humanas resulta em uma linhagem celular “imortalizada”, retendo as características fenotípicas observadas nas células primárias (PEREZ et al.⁷¹, 2003; GALLER et al.³³, 2006). A utilização destas células permite a investigação do metabolismo celular e interações célula-célula *in vitro* (SCHMALZ et al.⁸³, 2002; GALLER et al.³³, 2006).

Os fibroblastos V79 também são pertencentes a uma linhagem de células previamente estabelecida e estão disponíveis comercialmente. No presente estudo, estas células foram utilizadas, pois são indicadas para analisar o comportamento biológico de materiais dentários, devido suas características celulares estáveis, bem definidas em condições experimentais e sua relevância para análise *in vitro* envolvendo estes materiais (HUANG e CHANG³⁹, 2002; TAI et al.¹⁰²,

2001). Além disso, é uma linhagem geneticamente idêntica o que propicia experimentos reproduzíveis e padronizados (HUANG e CHANG³⁹, 2002).

A citotoxicidade de materiais em cultura de células pode ser analisada pelo método direto ou indireto. No método direto a cultura celular se prolifera em contato diretamente com o material (KOH et al.⁴⁷, 1998; BOUILLAGUET et al.¹¹, 2002; PEREZ et al.⁷¹, 2003), o que se aproximaria de situações *in vivo*, como por exemplo, uma exposição pulpar. Entretanto neste método, podem ocorrer alguns problemas técnicos como danos mecânicos às células ou contaminação, já que é difícil esterilizar um material sem alterar suas propriedades (SCHMALZ⁸¹, 1994). Já, no método indireto os espécimes são preparados e colocados em uma solução na qual os materiais são capazes de liberar suas substâncias formando extratos (SCHMALZ⁸¹, 1994).

Em diversos estudos na Literatura (HUANG e CHANG³⁹,⁴⁰, 2002; BOUILLAGUET et al.¹¹, 2002; SCHMALZ⁸⁴, 2002; CAVALCANTI et al.²⁰, 2005; DE-DEUS et al.²⁴, 2005; SCHWEIKL et al.⁸⁸, 2005; KARIMJEE et al.⁴⁵, 2006; DEMIRCI et al.²⁵, 2008) e no presente estudo, a citotoxicidade de materiais dentários foi mensurada utilizando extratos obtidos a partir destes materiais (método indireto).

O uso do método indireto é indicado para analisar substâncias liberadas pelos materiais durante o tempo de presa ou polimerização (CAVALCANTI et al.²⁰, 2005). Clinicamente, os materiais dentários são inseridos dentro da cavidade recém misturados, com presa incompleta e provavelmente após a aplicação clínica, respostas locais são provocadas pelos componentes não reagidos ou parcialmente reagidos destes materiais. Depois da presa, ainda é possível que constituintes potencialmente tóxicos possam ser liberados destes materiais (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002). Portanto, com o uso do método indireto, uma situação clínica também pode ser mimetizada, já que o tempo de presa ou polimerização dos materiais é realizado em ambiente úmido, permitindo

que o estudo seja ainda mais clinicamente relevante (CAVALCANTI et al.²⁰, 2005; VAJRABHAYA et al.¹⁰⁸, 2006).

No presente estudo os espécimes dos materiais foram preparados padronizados de acordo com as normas da ISO⁴³ (1992) em que a superfície do material em contato com o meio de cultura permitiu a liberação de substâncias pelo material durante o seu tempo de presa.

A maioria dos estudos utiliza o ensaio de MTT para análise de citotoxicidade *in vitro* de materiais dentários, o qual se baseia na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria por meio da ação da enzima succinato desidrogenase fornecendo, então uma medida de função mitocondrial das células (HUANG e CHANG^{39,40}, 2002).

No entanto, neste estudo, foi escolhido o teste de cristal violeta para a verificação da sobrevivência celular, pois é um teste sensível para quantificar o número de células e também é capaz de monitorar a proliferação celular associada à resposta das células aos agentes tóxicos. O cristal violeta é um corante básico que promove manchamento das proteínas do núcleo celular e a densidade óptica do corante é mensurada em um espectrofotômetro (GILLIES et al.³⁴, 1986). Este método tem sido utilizado para avaliar a citotoxicidade de materiais, medicamentos ou toxinas de patógenos com a finalidade de determinar a viabilidade e proliferação de células (CASTRO-GARZA et al.¹⁷, 2007).

No teste de ROS foi utilizada a sonda fluorescente (H₂DCF-DA) a qual é sensível na detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esta sonda apresenta uma grande vantagem, podendo ser usada como marcador oxidativo tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Por ser um grupo diacetato apolar, essa sonda difunde-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, este grupo diacetato é facilmente hidrolisado por enzimas esterases citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH. Por ser,

agora, polar, essa molécula proporciona um excelente substrato ao H_2O_2 gerado em excesso durante o aumento do metabolismo oxidativo. Outra grande vantagem desse método está na sua alta sensibilidade de detecção de ROS, permitindo a análise quantitativa destes na ordem de picomolar, como normalmente é esperado em condições fisiológicas (SILVEIRA⁹⁴, 2004).

A quantidade de produção de ROS e a análise do ciclo celular foram medidas por citometria de fluxo (FACS) que é capaz de mensurar os sinais de fluorescência emitidos pelas células. Estes sinais de fluorescência são capturados pelo feixe de laser argônio do FACS. Na análise dos resultados do teste de ROS, as médias geométricas destes sinais de fluorescência obtidas pela análise em FACS (Anexo B) foram transformadas em um fator de fluorescência, sendo que quanto maior este fator, maior a produção de ROS pelas células.

Na análise do ciclo celular foi utilizado o corante fluorescente iodeto de propídio (PI) o qual é capaz de se ligar às cadeias de DNA, mas não consegue atravessar uma membrana plasmática saudável (SILVA et al.⁹³, 2003). Portanto, este corante permite a mensuração de células necrosadas e apoptóticas em que ocorre um aumento da permeabilidade da membrana. Este corante é capaz de ser excitado com a luz do laser argônio e, portanto mensurado pelo FACS (Anexo C).

No presente estudo, alguns materiais foram utilizados como controle positivo servindo como referência para a análise da citotoxicidade e genotoxicidade dos materiais experimentais.

O Vitrebond é um cimento ionômero de vidro modificado acrescido de resina fotopolimerizável, indicado como base cavitária sob restaurações de amálgama, resinas compostas, cerâmicas ou metálicas (SOUZA-COSTA et al.⁹⁸, 2003). Este material foi incluído no presente estudo porque apresenta citotoxicidade a fibroblastos da polpa *in vitro* (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001; GALLER et al.³², 2005). Estudos *in vivo*

mostraram que não houve reação adversa do tecido pulpar quando o Vitrebond foi colocado em cavidades profundas de dentes humanos (SOUZA-COSTA et al.⁹⁷, 2003). Entretanto, estes testes foram realizados em dentes sem nenhuma alteração pulpar, sendo que a polpa saudável pode ser capaz de minimizar esta citotoxicidade. No entanto, não se sabe se uma polpa com alteração prévia, decorrente, por exemplo, de uma agressão por cárie, é capaz de responder da mesma maneira (GALLER et al.³², 2005). Além disso, de acordo com nossos resultados encontrados no teste piloto, o Vitrebond é também capaz de induzir a liberação de ROS em células tHPC e V79.

O TEGDMA é um componente comum a adesivos dentinários e resinas compostas capaz de reduzir a viscosidade e aumentar a adesividade à dentina (REICHL et al.⁷⁴, 2008). Este material foi utilizado como controle positivo no teste de ROS, porque induz a liberação de espécies reativas de oxigênio pelas células tHPC (DEMIRCI et al.²⁵, 2008). O TEGDMA também foi utilizado na análise do ciclo celular porque é um material que causa alterações no DNA celular e causa atraso no ciclo celular normal de células V79 (SCHWEIKL et al.^{89, 91}, 2005; 2007).

O EMS foi utilizado no teste de micronúcleos, pois é um material que comprovadamente causa grande indução de micronúcleos nas células V79, sendo considerado um material altamente genotóxico (SCHWEIKL e SCHMALZ⁸⁶, 2000; SCHWEIKL et al.^{87, 88}, 2004, 2005; DEMIRCI et al.²⁵, 2008).

Neste estudo verificou-se que os dois tipos de MTA não foram capazes de induzir citotoxicidade severa sobre as células tHPC, entretanto o MTA cinza provocou uma pequena diminuição da sobrevivência celular no extrato original (1:1) e na diluição 1:2. Portanto, o teste de genotoxicidade MNT foi realizado apenas para o MTA cinza a fim de analisar se este era capaz de induzir a formação de micronúcleos. Neste teste as diluições dos materiais experimentais (HC - 1:8 e 1:16,

MTA e POM – 1:1 e 1:2) foram escolhidas de acordo com os resultados do teste piloto em que verificou-se que diluições menores provocaram morte celular acentuada das células V79 impossibilitando a contagem do número de micronúcleos.

Pode-se verificar no teste de citotoxicidade que o POM foi capaz de induzir uma proliferação de células tHPC em diluições menores (1:1 e 1:2), portanto achou-se interessante realizar o teste da análise do ciclo celular para que pudéssemos analisar se este material também induz uma proliferação celular em células V79. Apesar do MTA cinza e o HC não causarem a mesma proliferação celular no teste de citotoxicidade, estes foram incluídos na análise do ciclo celular para verificarmos qual o comportamento das células V79 frente a estes materiais. As mesmas diluições do teste de MNT foram mantidas para a análise do ciclo celular.

6.2 Discussão dos Resultados

O desenvolvimento de materiais dentários com diferentes composições químicas, propriedades e recomendações de aplicação clínica tem sido constantemente introduzido na Endodontia. No entanto, a maioria destes materiais endodônticos entra em contato ou interage com o tecido conjuntivo e com fluidos tissulares, de maneira que a seleção de um novo material deve considerar não somente as propriedades mecânicas e físico-químicas, mas também a compatibilidade biológica (SOUZA-COSTA et al.⁹⁷, 2003).

Os materiais utilizados na terapia endodôntica poderiam causar algum dano ou irritação persistente ao tecido pulpar e/ou periapical que levariam a degeneração destes tecidos e conseqüente atraso no processo de reparo (DE-DEUS et al.²⁴, 2005; MIN et al.⁵⁶, 2007).

Assim, o entendimento dos mecanismos de citotoxicidade e genotoxicidade destes materiais nas células se torna necessário para a seleção adequada de um material que permitirá a reparação do complexo dentino-pulpar e/ou dos tecidos periapicais (MANTELLINI et al.⁵¹, 2003). A ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos é um pré-requisito básico para qualquer material biológico ser colocado em contato com células do tecido pulpar e/ou periapical (KOLINIOTOU-KOUMPIA e TZIAFAS⁴⁶, 2007).

O comportamento biológico de materiais dentários deve ser avaliado em três etapas. A primeira etapa é examinar um material realizando uma série de experimentos de citotoxicidade *in vitro*. Em segundo, avaliar se o material testado é um agente tóxico *in vivo*, o que pode ser realizado por meio da implantação subcutânea em animais e análise da reação tecidual local. Finalmente, os efeitos *in vivo* do material

sobre as células do tecido alvo devem ser avaliados em animais ou seres humanos (TAI et al.¹⁰², 2001; HUANG e CHANG³⁹, 2002; SOUSA et al.⁹⁵, 2004). Schmalz⁸¹ (1994) e Perez et al.⁷¹ (2003) também estão de acordo que testes *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados para a avaliação do comportamento biológico de um material. Entretanto, Souza-Costa et al.⁹⁸ (2003) relatam que os testes *in vivo* são mais aceitáveis para mensurar a biocompatibilidade de materiais dentários.

6.2.1 Testes de biocompatibilidade *in vivo* de materiais endodônticos

Alguns estudos *in vivo* têm sido realizados com o propósito de avaliar as propriedades biológicas de materiais utilizados em tratamentos endodônticos.

A implantação subcutânea ou óssea de materiais em animais e a avaliação da reação tecidual local é um teste *in vivo* bastante utilizado para verificar a biocompatibilidade. O MTA (ProRoot) e o cimento Portland foram implantados em mandíbulas de porcos e foi observado reparação óssea e resposta inflamatória leve, sugerindo que ambos os materiais são biocompatíveis (SAIDON et al.⁸⁰, 2003). Holland et al.³⁸ (2002) relatam também que após 30 dias da implantação de MTA cinza ou branco em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, ambos os materiais apresentaram resposta inflamatória leve e formação de granulações de tecido duro evidenciando que os mecanismos de ação são similares.

Uma das indicações do Ca(OH₂) e MTA são os procedimentos de proteção pulpar indireta e direta e também em pulpotomias. A proteção pulpar direta é um tratamento em que um agente protetor é aplicado no tecido pulpar exposto para permitir que a polpa repare e mantenha sua vitalidade e função (MURRAY et al.⁵⁹, 2002; OLSSON et al.⁶⁴, 2006; TAKITA et al.¹⁰¹, 2006). Como materiais de

proteção pulpar direta, o MTA e o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ são capazes de influenciar positivamente no reparo e na formação de uma barreira de tecido mineralizado na polpa (MENEZES et al.⁵⁵, 2004; KARABUCAK et al.⁴⁴, 2005). Min et al.⁵⁶ (2007) relatam que o cimento Portland (à base de MTA) permite a expressão de genes responsáveis pelo processo de indução na formação de barreira dentinária relacionados à mineralização sobre cultura de células da polpa humana. O MTA branco e o cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foram avaliados como materiais de pulpotomia em pré-molares humanos, relatando que o MTA branco induziu uma barreira dentinária mais homogênea e contínua com menor inflamação pulpar que o cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após 4 e 8 semanas do tratamento (CHACKO et al.²¹, 2006).

Entretanto, o início da formação desta dentina reparadora não ocorre devido ao efeito dos materiais, mas pelo controle da infecção e pelo processo de reparo do tecido (KARABUCAK et al.⁴⁴, 2005). Alguns autores acreditam que a presença desta barreira dentinária não necessariamente implica na saúde do tecido pulpar, sendo ao mesmo tempo uma resposta à reparação e uma reação à irritação (DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003; LU et al.⁴⁹, 2006). Além disso, a formação desta barreira não indica que a polpa será completamente selada em relação ao meio externo (FARACO e HOLLAND²⁷, 2001; DOMINGUEZ et al.²⁶, 2003).

Estudos em humanos e animais afirmam que o MTA e cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ são capazes de induzir a formação de barreira dentinária. Accorinte et al.² (2008) analisaram a resposta histomorfológica *in vivo* de dentes humanos capeados com MTA ou cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Após 30 dias do tratamento, uma diferença significativa do cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em relação ao MTA foi observada na formação de barreira dentinária. O MTA parece ter uma vantagem em induzir reparação em períodos de tempo mais curtos, entretanto, em 60 dias, ambos os materiais apresentaram resultados similares. Ainda Tziafas et al.¹⁰⁷ (2007) relatam que após 8 semanas da proteção pulpar direta com cimento de

Ca(OH₂) em dentes de cães com exposição pulpar, houve formação de uma barreira dentinária consistente.

Patel e Cohenca⁶⁸ (2006) relatam em caso clínico, que a polpa dentária de um dente permanente com cárie e ápice incompleto, foi protegida diretamente com MTA para evitar tratamento endodôntico. Após 11 meses de acompanhamento, verificou-se completa formação radicular, formação de barreira de dentina e manutenção da vitalidade pulpar. A resposta pulpar foi avaliada após a proteção pulpar de dentes de cães, revelando que o MTA cinza e branco apresentaram resposta inflamatória leve e formação de barreira de dentina, além disso, não foi observado sinais de necrose após 2 semanas do tratamento (PARIROKH et al.⁶⁶ 2005).

No entanto, devido algumas deficiências do Ca(OH₂) como pobre aderência à dentina, incapacidade de manter um adequado selamento contra microinfiltração bacteriana e porosidade na barreira de dentina formada, alguns autores tem como preferência o MTA no uso clínico (PATEL e COHENCA⁶⁸, 2006).

6.2.2 Ensaio de citotoxicidade

Os modelos *in vitro* de cultura celular têm sido utilizados para análise de citotoxicidade de materiais que se pretende utilizar em seres humanos (DE-DEUS et al.²⁴, 2005). Estes modelos são simples, reproduzíveis, possuem baixo custo, sendo relevantes e satisfatórios na avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002).

No entanto, alguns detalhes experimentais como modo de preparo das amostras, condições de presa dos materiais, preparo dos extratos em diversos solventes e pH podem influenciar nos efeitos

citotóxicos de materiais dentários em cultura de células eucarióticas (SCHWEIKL et al.⁸⁸, 2005). Saidon et al.⁸⁰ (2003) relatam que o MTA (ProRoot) e cimento Portland, imediatamente após espatulação, causaram diminuição na viabilidade celular, denaturação das células e proteínas do meio. Entretanto, as injúrias celulares diminuíram quando estes materiais alcançaram a presa completa.

O MTA é rico em óxido de cálcio o qual reage com a água e os fluidos tissulares, formando hidróxido de cálcio. O Ca(OH)_2 é capaz de liberar íons cálcio e hidroxila que provocam um aumento do pH (HOLLAND et al.³⁸, 2002; CAMILLERI et al.¹⁴, 2004; TAKITA et al.¹⁰¹, 2006). Fridland e Rosado³¹ (2005) verificaram altos valores de pH, enfatizando que o principal componente químico do MTA, capaz de manter um pH alto em solução aquosa, é pela formação do Ca(OH)_2 . Os autores relatam que em 78 dias o MTA apresentou altos valores de pH o que pode ser atribuído a continua liberação de Ca(OH)_2 por este material.

A manutenção de um alto pH ao longo do tempo pelo MTA pode apresentar relevância clínica uma vez que a alcalinidade cria um ambiente favorável para a divisão celular e a para reparação (FRIDLAND e ROSADO³¹, 2005). Entretanto, Menezes et al.⁵⁵ (2004) e Saidon et al.⁸⁰ (2003) demonstraram que o alto pH do MTA, principalmente imediatamente após a espatulação, causou denaturação das células adjacentes e proteínas teciduais. De-Deus et al.²⁴ (2005) verificaram que o MTA (Pro-Root e Angelus) e o cimento Portland foram citotóxicos em 24 h de exposição às células endoteliais humanas, provavelmente porque o alto pH destes cimentos causou denaturação das proteínas das células adjacentes.

Cavalcanti et al.²⁰ (2005) relatam que o cimento hidróxido de cálcio aumentou o pH do meio de cultura, observado pela mudança de cor, o qual possui fenol vermelho em sua composição como indicador de pH. No presente estudo, o pH dos extratos originais do HC, MTA e do POM foram mensurados em cada experimento e apresentaram-se em

torno de 7 a 7,8 observado-se uma ligeira alteração de cor do meio de cultura, entretanto esta alteração não causou influência na sobrevivência celular.

Os testes e os tipos de células utilizados em cada estudo também podem influenciar na caracterização do comportamento biológico de materiais dentários *in vitro*. Os testes enzimáticos são mais indicados uma vez que a maioria dos materiais dentários são hidrofílicos e provavelmente capazes de liberar componentes iônicos no meio, o que é melhor para interferir na atividade enzimática intracelular do que influenciar na permeabilidade da membrana celular (SCHMALZ e SCHWEIKL⁸², 1996). No presente estudo a citotoxicidade dos materiais experimentais foi determinada quantitativamente por meio do teste enzimático de cristal violeta baseado na coloração de proteínas do núcleo apenas de células viáveis sendo, portanto, adequado para a análise destes materiais.

Diferentes culturas celulares, incluindo células de linfoma de ratos, células endoteliais humanas, células de hamster Chinês, células humanas de osteosarcoma são capazes de se multiplicar rapidamente com um ilimitado tempo de vida. No entanto, os resultados obtidos nestas células podem ser diferentes daqueles obtidos em um tecido humano *in vivo* (MIN et al.⁵⁶, 2007). Neste estudo verificou-se que as células V79 são mais sensíveis que as células tHPC, uma vez que as mesmas diluições dos materiais induziram respostas diferentes entre estas duas linhagens celulares. Os extratos dos materiais provocaram maior morte celular nas células V79 que nas células tHPC em diluições idênticas.

As células pulpares são importantes para a função homeostática do tecido pulpar e são as principais responsáveis pelo processo de reparo quando ocorrem injúrias físicas, químicas ou microbianas ao tecido pulpar. Depois da injúria, o tecido pulpar exerce o inerente potencial de reparo e regeneração. O reparo do dano depende da capacidade das células pulpares adjacentes proliferarem e migrarem

para dentro do tecido danificado e secretar diversas matrizes protéicas, promover a homeostasia da área e iniciar o processo de reparação (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002).

Como os materiais endodônticos são indicados para o uso em áreas inflamadas ou infectadas, devem ser biocompatíveis e não afetarem o comportamento celular. Em toda situação clínica na qual os materiais endodônticos são indicados, estes ficarão em contato com as células do tecido pulpar, periapical ou periodontal (Rezende et al.⁷⁵, 2007).

O fabricante do cimento Hydro C (Dentsply) indica este material para proteção pulpar direta, entretanto esta indicação é questionável uma vez que no presente estudo, este material foi capaz de inibir a proliferação de células pulpares humanas após 24 h, exibindo uma taxa de sobrevivência celular em torno de 9 a 20%, o que denota a alta citotoxicidade deste material. Ainda a taxa de sobrevivência celular (20,5%) do extrato original do HC pode não ser real, uma vez que a diluição 1:2 mostrou 8,9% de sobrevivência celular, sendo que este fato poderia ser explicado pela fixação de células não-viáveis sem que ocorra a sua deteriorização mas permitindo o seu manchamento pelo corante. Portanto, estes resultados sugerem que este material poderia prejudicar a função das células pulpares no processo de reparo, sendo que o pó de Ca(OH)_2 ou MTA deveriam ser indicados em casos de exposições do tecido pulpar.

Entretanto, Cavalcanti et al.²⁰ (2005) relatam que o cimento de Ca(OH)_2 não foi capaz de mudar o comportamento de fibroblastos pulpares de dentes permanentes humanos, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na sobrevivência e proliferação celular comparado ao grupo controle, sendo um material, portanto, não citotóxico nas condições em que o estudo foi realizado.

Min et al.⁵⁶ (2007) compararam os efeitos citotóxicos do cimento Portland com outros materiais, incluindo o cimento de Ca(OH)_2 , sobre cultura de células pulpares humanas. O cimento de Ca(OH)_2 propiciou uma taxa de sobrevivência celular menor que 40%, enquanto que o cimento Portland promoveu proliferação celular, sendo considerado um material não citotóxico. Ainda Takita et al.¹⁰¹ (2006) relatam que o MTA branco apresentou uma maior proliferação celular em células pulpares humanas que o cimento de Ca(OH)_2 . Estes resultados estão de acordo com o presente estudo onde foi verificado que o MTA exibiu uma taxa de sobrevivência celular semelhante ao grupo controle em células pulpares humanas.

Em outras linhagens celulares humanas ou animais, estudos mostram também que o MTA é capaz de manter a viabilidade celular próxima de 100%. O comportamento do MTA (ProRoot e Angelus) foi avaliado em dois tipos de linhagens celulares (macrófagos M1 e M2) e estes materiais mantiveram a viabilidade celular consistentemente alta, sendo similar ao grupo controle (REZENDE et al.⁷⁵, 2007). Ainda estes materiais apresentaram baixa citotoxicidade em células V79 e macrófagos murino (SOUZA et al.⁹⁶, 2006).

O MTA não foi citotóxico em células humanas de osteosarcoma (MG-63), causando proliferação destas células *in vitro* (MITCHELL et al.⁵⁷, 1999; HUANG et al.⁴¹, 2003). Ainda Osorio et al.⁶⁵ (1998) relatam que o MTA não foi citotóxico para células L929 nem para fibroblastos humanos gengivais. Entretanto, alguns estudos relatam que osteoblastos primários apresentaram uma baixa viabilidade celular quando em contato com MTA (PEREZ et al.⁷¹, 2003) e que o MTA (ProRoot e Angelus) reduziu em 20% a viabilidade celular de fibroblastos humanos gengivais após 72 h (GUVEN et al.³⁵, 2007).

O MTA é encontrado de duas cores no mercado, sendo que a maioria dos estudos tem avaliado o MTA cinza, já que o MTA branco foi introduzido no mercado mais recentemente (CAMILLERI et

al.¹⁴, 2004). Apesar da semelhança de formulações destes dois materiais, algumas diferenças são encontradas em seus comportamentos, como o MTA branco apresentar, clinicamente, tempo de presa mais longo que o MTA cinza (HOLLAND et al.³⁸, 2002). Além disso, a indicação destes materiais pode ser diferente em dentes anteriores e posteriores uma vez que Karabucak et al.⁴⁴ (2005) mostraram que em exposições pulpares em dentes anteriores protegidas com MTA cinza houve manchamento cervical devido à cor deste material e, portanto, estes autores sugerem o uso do MTA branco para prevenir este inconveniente.

Alguns estudos em culturas celulares foram realizados para comparar o MTA branco e cinza. O MTA branco apresentou menor citotoxicidade que o MTA cinza em diferentes tipos de linhagens celulares sendo que esta diferença pode ser devido à morfologia da superfície ou composição química destes materiais, uma vez que o MTA branco tem uma quantidade reduzida de ferro na sua composição (PEREZ et al.⁷¹, 2003). No entanto, Camilleri et al.¹⁴ (2004) mostraram que não houve diferença entre as duas variantes de MTA (branco e cinza), sendo que, ambos proporcionaram crescimento celular reduzido após 28 dias em células humanas de osteosarcoma.

No presente estudo, após 24 h de exposição às células pulpares humanas, verificou-se que apesar do extrato original (1:1) do MTA cinza (Angelus) causar uma pequena diminuição de 18% na sobrevivência celular, este não foi citotóxico. Já, o MTA branco exibiu uma alta sobrevivência celular (90%) semelhante ao grupo controle. Em concordância com o presente estudo, Ribeiro et al.⁷⁶ (2005) relatam, pelo teste de azul de Trypan, que o MTA cinza ou branco (Angelus) não foram capazes de interferir na sobrevivência celular de células de linfoma de ratos em qualquer concentração testada.

Alguns autores acreditam que uma das principais razões para o MTA provocar indução de proliferação celular e ser um material não citotóxico pode ser devido à contínua liberação de íons cálcio por

este material (CAMILLERI et al.¹⁴, 2004; TAKITA et al.¹⁰¹, 2006). Após 24 h, o MTA liberou uma grande quantidade de íons cálcio e induziu proliferação celular, sendo um material não citotóxico, entretanto, após 28 dias observou-se baixo crescimento celular e isso pode ser decorrente da menor quantidade de íons cálcio disponível (CAMILLERI et al.¹⁴, 2004). No entanto, Takita et al.¹⁰¹ (2006) relatam que a contínua liberação de íons cálcio pelo MTA durante 14 dias promoveu um aumento na proliferação das células pulpares *in vitro*.

Atualmente, as plantas medicinais apresentam-se em formulações desde artesanais até mais sofisticadas, fabricadas em escala industrial. O interesse global no aproveitamento da biodiversidade é crescente, representando a expansão de novas fronteiras de um mercado cada vez mais lucrativo em países desenvolvidos e a possibilidade do uso racional das riquezas naturais em prol da saúde pública em países em desenvolvimento, representando formas de terapia mais baratas e mais acessíveis (FRANCISCO et al.²⁹, 1998).

Na Odontologia, também o interesse por materiais fitoterápicos tem aumentado e alguns destes já estão sendo utilizados nos procedimentos clínicos. O polímero derivado do óleo da mamona tem sido utilizado como preenchimento de retrobturações em cirurgias paraendodônticas, cimento obturador de canais radiculares (PASCON et al.⁶⁷, 2001; PERASSI⁷⁰, 2004) e como agente irrigante (FERREIRA et al.²⁸, 2002; SOUZA-JUNIOR et al.⁹⁹, 2004).

Os produtos fitoterápicos têm sido utilizados freqüentemente no tratamento ou prevenção de doenças. Entretanto, muitas espécies de plantas sintetizam substâncias químicas tóxicas, aparentemente para utilizarem como defesa primária contra bactérias, fungos, insetos e outros predadores. Por isso é importante avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos destes produtos antes da sua utilização em seres humanos na prática clínica (MAISTRO et al.⁵⁰, 2004).

O comportamento biológico de uma solução de própolis foi avaliado quando utilizada sobre exposições pulpares em dentes de ratos. Após 4 semanas, o própolis diminuiu a resposta inflamatória e estimulou o reparo de dentina promovendo a formação de uma barreira dentinária incompleta (SABIR et al.⁷⁹, 2005). A biocompatibilidade de um floculado de resina de mamona, comercialmente disponível, foi testada utilizando como modelo experimental o reparo ósseo alveolar de ratos. Os flocos de resina poliuretana de mamona, implantados na cavidade de extração dentária de ratos, mostraram-se biocompatíveis e capazes de proporcionar certo grau de osseointegração direta (LAMANO CARVALHO et al.⁴⁸, 1997; CALIXTO et al.¹², 2001).

A reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos foi avaliada, após a implantação de tubos de polietileno preenchidos com um cimento experimental derivado do polímero da mamona (Poliquil) evidenciando um ótimo comportamento biológico deste cimento (PERASSI⁷⁰, 2004). Ainda a biocompatibilidade do polímero derivado do óleo da mamona (POM, Poliquil) comparado ao Hydro C foi avaliada em tecidos subcutâneos de ratos evidenciando que o POM induziu menor resposta inflamatória em longos períodos de observação, portanto podendo ser um material mais biocompatível em procedimentos odontológicos (CAMARGO et al.¹³, 2007).

Como o polímero derivado do óleo da mamona ainda é um cimento experimental na Odontologia, a análise da citotoxicidade deste material na Literatura é escassa. O comportamento biológico do polímero de mamona foi analisado, *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de ser utilizado como cimento de obturação endodôntica. Este material não foi citotóxico às células L929 *in vitro* e foi um material biocompatível *in vivo*, apresentando condições biológicas favoráveis para sua utilização como material de obturação endodôntica (PASCON et al.⁶⁷, 2001). Ainda o polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio ou fosfato de

cálcio não foi citotóxico às células da medula óssea de ratos *in vitro* (BELOTI et al.⁸, 2003).

No presente estudo foi observado que o POM não foi citotóxico às células pulpares humanas *in vitro*. A taxa de sobrevivência celular no extrato original (105,2%) foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle, sugerindo que este material foi capaz de promover proliferação celular. De acordo com os resultados obtidos neste estudo em que o POM apresentou comportamento biológico excelente às células humanas da polpa dentária, este material possui um potencial para ser utilizado em procedimentos de proteção pulpar direta. Além disso, os resultados apresentados neste estudo podem ser um argumento adicional para suportar a utilização do POM na prática odontológica.

Como descrito anteriormente, o Vitrebond foi utilizado no presente estudo como um material de controle. Estudos *in vivo* mostraram que o Vitrebond aplicado como base cavitária em cavidades profundas de dentes humanos não provocou respostas inflamatórias pulpares ou desorganização tecidual (SOUZA-COSTA et al.⁹⁷, 2003). Os autores relatam que a resposta do complexo dentino-pulpar foi similar a encontrada no cimento de Ca(OH₂). Ainda Souza-Costa et al.⁹⁸ (2003) relatam em um estudo *in vivo* realizado em polpas de ratos, que o Vitrebond bem como o cimento de Ca(OH₂) permitiram reparo do tecido pulpar e formação de barreira dentinária após 60 dias da proteção deste tecido.

Entretanto, de acordo com o fabricante (3M Medica GmbH, Borken, Germany), o Vitrebond não é indicado para proteção pulpar direta. Se uma exposição pulpar ocorrer, é recomendado que esta seja protegida com o pó de hidróxido de cálcio (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001).

Os cimentos ionômeros de vidro fotopolimerizáveis apresentam potencial significativo para toxicidade pulpar pela inibição de crescimento, proliferação celular e síntese de proteínas em cultura de

células pulpares humanas (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002). No presente estudo, verificou-se *in vitro* que o Vitrebond provocou diminuição acentuada na sobrevivência celular das células pulpares humanas, sendo um material potencialmente citotóxico. De acordo com nossos resultados, o cimento Vitrebond também apresentou, em células pulpares bovinas, taxas de sobrevivência celular significativamente mais baixas que o grupo controle (SCHUSTER et al.⁸⁵, 2001).

Além disso, o cimento ionômero de vidro apresentou alta citotoxicidade após 24 h de exposição em células humanas do ligamento periodontal quando comparado ao MTA (KARIMJEE et al.⁴⁵, 2006; VAJRABHAYA et al.¹⁰⁸, 2006).

6.2.3 Teste de ROS

Entretanto, investigações de citotoxicidade *in vitro* por meio de testes enzimáticos ainda podem ser limitadas para caracterização de algumas alterações que os materiais dentários podem causar nas células eucarióticas (SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006). Portanto, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células eucarióticas na presença de materiais dentários é um indicativo do potencial oxidativo destes materiais (SPAGNUOLO et al.¹⁰⁰, 2006).

Os organismos aeróbicos produzem e degradam ROS, originando tanto concentrações fisiológicas (resultantes da realização de funções celulares fisiológicas), como quantidades excessivas que, ao superarem as defesas antioxidantes naturais dão origem a um estado denominado estresse oxidativo (NORDBERG e ARNÉR⁶¹, 2001).

Uma produção excessiva de ROS tem sido relatada em processos, como inflamação ou na defesa contra infecções (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001; CASTRO-SILVA¹⁸, 2004). A alta

quantidade de ROS pode causar quebra em múltiplos sítios celulares, resultando em peroxidação lipídica, oxidação protéica e danos ao ácido nucléico. A quebra destas macromoléculas por meio de reações de radicais livres dentro das células pode dificultar a função celular ou conduzir a morte celular precoce (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001).

Além disso, a produção não regulada de ROS tem potencial para criar reações de radicais livres nas quais espécies reativas mais destrutivas poderiam ser produzidas o que poderia ser uma desvantagem para a célula por interferir na sua função macromolecular (BAUMGARDNER e SULFARO⁷, 2001; SILVEIRA⁹⁴, 2004). Portanto, ROS devido sua elevada reatividade são considerados como potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (NORDBERG e ARNÉR⁶¹, 2001).

No presente estudo, MTA cinza, MTA branco e POM não promoveram aumento dos níveis de ROS em nenhuma das diluições testadas em relação ao grupo controle negativo. Verificou-se que o HC causou um pequeno aumento na produção de ROS, entretanto, sem diferença significativa ao grupo controle negativo. Estes resultados sugerem que MTA cinza, MTA branco e POM não são capazes de alterar os níveis de ROS produzidos pelas células normalmente (em condições fisiológicas). Portanto, estes materiais não foram capazes de interferir com o metabolismo celular quando colocados em contato com as células pulpares humanas *in vitro*.

A influência do MTA na produção de espécies intermediárias reativas de oxigênio (ROI) foi verificada em macrófagos peritoniais (M1 e M2), sendo que os M2 demonstraram maior viabilidade celular e menor produção de ROI quando comparados ao M1. No entanto, o MTA não interferiu com o metabolismo celular fisiológico dos M1 e M2 (REZENDE et al.⁷⁵, 2007).

Neste presente estudo foi utilizado o TEGDMA como controle no teste de ROS, pois é uma substância que causa alterações na

estabilidade de reações de oxi-redução resultando em um aumento dos níveis de ROS e subsequente morte por apoptose (SCHMALZ et al.⁸³, 2002; SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006). Além disso, o TEGDMA pode causar efeitos inibitórios na síntese de DNA e proteínas em células humanas (KOLINIOTOU-KOUMPIA e TZIAFAS⁴⁶, 2005).

As concentrações de 1,5 mmol/l e 3 mmol/l do TEGDMA, as quais foram usadas como referência aqui, aumentaram a quantidade de ROS 2,5 e 4 vezes, respectivamente, em relação às células não tratadas (controle negativo). Estes achados estão de acordo com estudos que mostraram a indução de estresse oxidativo causado pelo TEGDMA (SCHWEIKL et al.⁸⁹, 2005; SPAGNUOLO et al.¹⁰⁰, 2006). No presente estudo, o extrato original do Vitrebond (1:1) foi capaz de aumentar os níveis de ROS em até 7 vezes quando comparado ao grupo controle negativo. Ainda este material induziu a produção de ROS mais que o controle positivo (TEGDMA), sendo considerado um material altamente citotóxico às células pulpares humanas.

6.2.4 Ensaios de genotoxicidade

Neste estudo, a escolha da linhagem de células V79 para o teste de micronúcleo (MNT) foi baseada no fato que este teste somente pode ser realizado eficientemente em população de células em que a cinética da divisão celular é muito bem entendida e controlada (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al.⁵, 2006). Assim, a quantificação de micronúcleos nas células V79 tem como objetivo analisar os efeitos mutagênicos dos materiais testados sobre estas células. Além disso, é uma linhagem de células estabelecida e recomendada para análise de efeitos genotóxicos (SCHWEIKL et al.⁹¹, 2007).

Portanto, o potencial genotóxico de materiais dentários pode ser avaliado por meio de do teste MNT o qual é capaz de mensurar a quantidade de micronúcleos, que são fragmentos pertencentes ao DNA celular que se desprendem durante a divisão celular. A formação destes micronúcleos indica que houve alteração irreversível do DNA durante a replicação celular (SCHWEIKL e SCHMALZ⁸⁶, 2000).

O EMS é reconhecidamente uma substância genotóxica, pois causa mutação genética e induz formação de micronúcleos (SCHWEIKL e SCHMALZ⁸⁶, 2000; SCHWEIKL et al.⁸⁷, 2004). Devido a estas características, este material foi utilizado como controle positivo no presente estudo, e o mesmo causou aumento significativo no número de micronúcleos em células V79, comprovando o seu potencial genotóxico.

No presente estudo, o HC, MTA e POM não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo tratado com EMS (controle positivo). Estes materiais apresentaram um número de micronúcleos semelhante ao grupo não tratado (controle negativo), indicando que estes materiais não são genotóxicos nas condições experimentais do estudo. A genotoxicidade do MTA foi analisada pelo teste de gel em agarose (cometa) e este material também não foi genotóxico (RIBEIRO et al.⁷⁶, 2005; RIBEIRO et al.⁷⁷, 2006).

O ciclo celular, período entre duas divisões mitóticas, consiste em uma seqüência ordenada de fases extremamente reguladas: G1, S, G2 e M. A fase G1 é caracterizada por expressão de genes e síntese de proteínas o que permite o crescimento celular e a produção das proteínas necessárias para a síntese do DNA. Durante a fase S, a célula realiza a replicação do DNA e na fase G2 ocorre novamente o crescimento celular e síntese de proteínas para o processo de divisão. Durante a fase M, a célula passa por um processo denominado citocinese, originando duas células-filhas. Após o término desta fase, a

célula tem duas opções, entrar na fase G1 e iniciar outro ciclo celular ou entrar em estado de latência (G0).

Os pontos de controle (*checkpoints*) do ciclo celular são caminhos regulatórios para monitorar o completo sucesso das fases G1, S e G2 das células eucarióticas. Pontos de controle intactos irão ativar respostas celulares ao dano do DNA por fatores endógenos e exógenos por meio das atividades reguladas de proteínas sensoras, transdutoras e efetoras. As células podem atrasar a ação dos pontos de controle para permitir o reparo do dano celular ou a inativação de fatores de estresse celular. Entretanto, defeitos nos sinais dos pontos de controle podem conduzir a um dano celular irreversível como mutação genética e dano cromossômico (SCHWEIKL et al.⁸⁹, 2005).

A morte celular pode ocorrer por duas vias distintas, necrose ou apoptose, embora possa ocorrer morte por mecanismos com características de ambas as vias.

A necrose é o processo resultante de uma disfunção celular aguda em resposta a condições de estresse ou após exposição das células a agentes tóxicos. É um processo que leva a uma rápida depleção de ATP celular. Morfologicamente, a necrose caracteriza-se pelo aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, seguida da conseqüente liberação dos conteúdos celulares para o meio intercelular. Esta libertação do conteúdo celular das células mortas pode provocar danos nas células vizinhas, assim como resultar no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (CASTRO-SILVA¹⁸, 2004).

A apoptose é um processo ativo de morte celular programada que desempenha um papel crucial no desenvolvimento e homeostasia dos organismos multicelulares. Este processo permite a remoção das células (danificadas ou indesejadas) que de outra forma poderiam prejudicar o bom funcionamento das células circundantes por meio do contato com os seus conteúdos citoplasmáticos. Durante a apoptose ocorre a diminuição do tamanho celular, condensação da

cromatina e formação de corpos apoptóticos (vesículas de pequenas dimensões que contêm no seu interior componentes celulares que são posteriormente fagocitados por células adjacentes) (MANTELLINI et al.⁵¹, 2003). Tanto a necrose como a apoptose podem resultar da exposição ao estresse oxidativo.

Alguns materiais dentários são capazes de alterar o ciclo celular normal das células eucarióticas e causar dano irreversível ao DNA celular e/ou induzir morte celular por necrose ou apoptose. A técnica de citometria de fluxo permite a quantificação de células em apoptose e determina a porcentagem de células viáveis em cada fase do ciclo celular após a exposição a um material (MOGHADDAME-JAFARI et al.⁵⁸, 2005).

O TEGDMA é capaz de causar dano oxidativo ao DNA das células V79 o que leva ao acúmulo destas células na fase G2 do ciclo celular (SCHWEIKL et al.⁹¹, 2007). Como consequência do dano ao DNA, a progressão das células por meio do ciclo celular normal será bloqueada. Este atraso no ciclo celular vai incapacitar a indução de reparo do DNA (SCHWEIKL et al.⁸⁸, 2005). A modificação do ciclo celular e os efeitos genotóxicos do TEGDMA parecem ser mediados, pelo menos em parte, pela produção de espécies reativas de oxigênio (SCHWEIKL et al.⁹¹, 2007).

No presente estudo verificou-se que o TEGDMA atrasou a progressão do ciclo celular das células V79. O dano do DNA parece ter sido reconhecido por mecanismos responsáveis pelo atraso da fase G1, uma vez que a proliferação da maioria das células V79 em culturas celulares tratadas com 1,5 mmol/l TEGDMA por 24 h foi bloqueado na fase G2.

O POM não apresentou influência sobre o ciclo celular das células V79 uma vez que não foram identificadas mudanças no padrão de distribuição entre as fases G1, S e G2 em relação ao grupo controle. No entanto, o HC (1:8) induziu um significativo aumento do

número de células nas fases G1 e G2 o que denota uma mudança da distribuição das células, entretanto sem levar ao atraso do ciclo celular.

O extrato original do MTA cinza mostrou uma pequena, mas significativa, diminuição do número das células da fase S e um aumento na fase G2 comparado ao grupo controle negativo. Moghaddame-Jafari et al.⁵⁸ (2005) relataram que o MTA branco (ProRoot) não induziu apoptose ou atraso do ciclo celular em células *odontoblasto-like* de ratos as quais são as principais células responsáveis pela reparação pulpar e regeneração da dentina. O MTA induziu uma significativa diminuição do número de células da fase G1 e um pequeno, mas significativa, aumento nas fases S e G2, sugerindo que o MTA pode ter um efeito positivo na regeneração do complexo dentino-pulpar *in vivo* (MOGHADDAME-JAFARI et al.⁵⁸, 2005).

No presente estudo, apesar do POM ter causado um aumento acentuado do número das células pulpares humanas (tHPC); não foi observado um aumento do número das células V79 na fase S o que indicaria uma alta atividade proliferativa deste material em relação ao grupo controle negativo.

A pesquisa em aspectos biológicos dos materiais dentários é possível devido à aproximação interdisciplinar de profissionais da Odontologia com a ciência farmacêutica, toxicologia, química e biologia. Além disso, os problemas básicos, estratégias para sua solução e métodos simples são muito similares para biomateriais com aplicações dentárias ou médicas, o qual mostra que a Odontologia é parte do cenário da Medicina (SCHMALZ⁸⁴, 2002).

A relevância clínica da identificação do potencial de materiais dentários e seus componentes induzirem citotoxicidade e/ou genotoxicidade em células e tecidos *in vitro* tem sido recentemente enfatizada (SCHMALZ⁸⁴, 2002).

Os testes *in vitro* são muito úteis para analisar os efeitos biológicos de materiais dentários, mas eles podem ser limitados na sua

capacidade para simular uma condição clínica, sendo que pode ser pouco realista transferir achados *in vitro* para situações *in vivo* (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002). Além disso, testes *in vitro* não estimulam as reações de defesa dos tecidos como inflamação, respostas imunológicas do organismo ou outros mecanismos de reparo (GALLER et al.³², 2005). Entretanto, é necessário continuar investigando os materiais dentários buscando um material que apresente propriedades ideais *in vitro* (HUANG e CHANG⁴⁰, 2002).

As reações da polpa dentária *in vivo* podem ser originadas a partir de muitos fatores, como a toxicidade de materiais endodônticos (LU et al.⁴⁹, 2006). No presente estudo, apesar de verificarmos *in vitro* que o cimento de hidróxido de cálcio foi citotóxico e causou um pequeno estímulo na produção de ROS às células da polpa dentária, a situação *in vivo* pode ser diferente.

A dentina pode ser um importante protetor da polpa dentária dos efeitos das substâncias liberadas pelos materiais. É difícil determinar quanto destas substâncias liberadas são capazes de se difundir por meio da dentina e atingir o tecido pulpar. Além disso, a circulação pulpar *in vivo* pode remover e reduzir as concentrações dos agentes tóxicos sobre as células pulpares. No tecido pulpar, o número de células é maior que a cultura celular *in vitro*. Ao mesmo tempo, vasos sanguíneos e linfáticos estão presentes no tecido vivo, diluindo as substâncias (CAVALCANTI et al.²⁰, 2005).

Entretanto, materiais que não apresentem reações indesejáveis em testes *in vitro* têm potencial para ser inócuo ao tecido pulpar se outros fatores como contaminação bacteriana pudessem ser excluídos (GALLER et al.³², 2005). Ainda, os resultados obtidos em ensaios *in vitro* podem ser indicativos para os efeitos observados *in vivo* (RIBEIRO et al.⁷⁷, 2006).

Portanto, os testes em cultura celular para avaliação da toxicidade de materiais dentários é uma valiosa ferramenta para a

compreensão do comportamento biológico destes materiais, se as limitações do método forem levadas em consideração, especialmente na interpretação dos resultados (SCHMALZ⁸¹, 1994).

Assim, danos na membrana celular, inibição de atividades enzimáticas ou de proteínas, de síntese de RNA e DNA, ou simplesmente a estimativa do número de células viáveis após o tratamento com materiais dentários são alguns indicadores utilizados para descrever as modificações na função básica celular (SCHWEIKL et al.⁹⁰, 2006).

Diante da disponibilidade de tantos testes *in vitro*, o mais importante, é saber que estes devem servir para delinear as alterações que um material pode causar nas funções básicas celulares, e principalmente se estas alterações são capazes de prejudicar estas funções permanentemente.

De acordo com as condições experimentais e os resultados deste estudo, o HC é um material que deve ser utilizado com cautela na clínica odontológica, especialmente em exposições pulpares diretas, uma vez que alterou o comportamento biológico de células pulpares *in vitro*. Além disso, é interessante ressaltar que o POM é um material promissor para a utilização em contato com o tecido pulpar, considerando que este não induziu a produção de ROS e não foi citotóxico às células pulpares humanas, além de causar uma acentuada proliferação destas células, o que pode sugerir a utilização deste material em contato com o tecido pulpar em situações clínicas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) O POM causou proliferação acentuada das células tHPC *in vitro*, não apresentando citotoxicidade e nem induzindo produção de ROS nestas células. O MTA cinza e o branco apresentaram comportamento semelhante no ensaio de citotoxicidade e também não induziram a produção de ROS.
- b) O HC apresentou citotoxicidade e um pequeno aumento na produção de ROS sobre as células tHPC, porém seu comportamento nos demais testes realizados foi satisfatório.
- c) Todos os materiais experimentais não foram genotóxicos e nem causaram atraso no ciclo celular das células V79, evidenciando que estes materiais não são mutagênicos nas condições em que o estudo foi realizado.

8 REFERÊNCIAS*

1. Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Muench A, Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mat.* 2005; 21, 599-607.
2. Accorinte MLR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan ED, Souza V et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod.* 2008; 34:1– 6.
3. Andelin W E, Browning D F, Hsu G H R, Roland DD, Torabinejad M. Microleakage of resected MTA. *J Endod.* 2002; 28(8):573-4.
4. Andelin W E, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin Sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod.* 2003; 29(10):646-50.
5. Andrighetti-Fröhner CR, Kratz JM, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by comet and micronucleus assays. *Mutat Res.* 2006; 603:97–103.

* Baseado em: International Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals simple references [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; 2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

6. Barros VMR, Rosa AL, Beloti MM, Chierice G. *In vivo* biocompatibility of three different chemical compositions of *Ricinus communis* polyurethane. J Biomed Mater Res A. 2003; 67: 235–239.
7. Baumgardner K R, Sulfaro M A. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. J Endod. 2001; 27(3):190-5.
8. Beloti MM, Hiraki KR, Barros VM, Rosa AL. Effect of the chemical composition of *Ricinus communis* polyurethane on rat bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. J Biomed Mater Res A. 2003; 64:171-6.
9. Bernabé PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. Braz Dent J. 2005; 16(2):149-55.
10. Bernabé PFE, Gomes-Filho JE, Rocha WC, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. Int Endod J. 2007; 40:758–765.
11. Bouillaguet SL, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. J Oral Rehab. 2002; 29:7-13.
12. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Implante de um floclado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. Pesq Odontol Bras. 2001; 15(3):257-62.

13. Camargo SEA, Rode SM, Prado RF, Carvalho YR, Camargo CHR. Subcutaneous tissue reaction to pulp capping materials in rats. Annals of 85th General Session & Exhibition of the IADR. New Orleans; 2007.
14. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2004; 37:699–704.
15. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. Int Endod J. 2006; 39:747–54.
16. Camps J, Salomon JP, Pertot WJ, Dejou J. The coherence between 3 evaluation methods of biocompatibility. J Biol Buccale 1992; 20(4):211–7 (Abstract).
17. Castro-Garza J, Barrios-Garcia HB, Cruz-Veja DE, Said-Fernandez S, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA et al. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Med Microbiol. 2007; 56:733–37.
18. Castro-Silva JPMS. Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na proteção do estresse oxidativo [dissertação]. Portugal: Escola de Ciências, Universidade do Minho; 2004.
19. Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KMA et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. Food Chem Toxicol. 2006; 44:388–92.

20. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005; 38(8):505-9.
21. Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent.* 2006; 30:203-9.
22. Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod.* 1998, 24(9):604-6.
23. Cohen S, Hargreaves KM. *Pathways of the pulp.* 9.ed. St Louis: Mosby 2006.
24. De-Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005; 38:604-9.
25. Demirci M, Hiller K-A, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mat.* 2008; 24(3):362-71.
26. Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod.* 2003; 29 (5):324-33.
27. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol.* 2001; 17(4):163-6.

28. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres SA, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002; 13(2):118-22.
29. Francisco LM. Vegetal polyurethane resin implant in cranioplasty. Experimental studies in rabbits [dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP; 1998.
30. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4.ed. Indianapolis: Wiley-Liss, 2000.
31. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod.* 2005; 31(5):376-9.
32. Galler K, Hiller K-A, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting material. *J Endod.* 2005; 31(5):396-9.
33. Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 138–146.
34. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986; 159:109–13.
35. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts *in vitro*. *J Endod.* 2007; 33(4):447-50.

36. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root canal-filling materials. *Int Endod J.* 2003; 36:147-60.
37. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J.* 1988, 21(2):89-99. Apud Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int Endod J.* 2002; 35:905-9.
38. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2002; 13(1): 23-6.
39. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int Endod J.* 2002; 35:905-9.
40. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94:361-5.
41. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogenactivated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomater.* 2003; 24:3909–13.
42. Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierice GO. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. *Rev Bras Ortop.* 2002; 37(5):187-94.

43. ISO documento 10993, Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity *in vitro* methods, 1992.
44. Karabucak B, Li D, Lim J, Iqbal M. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. *Dent Traumatol*. 2005; 21: 240–43.
45. Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG, Lincoln NE, Rochester MN. Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102:115-20.
46. Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent*. 2005; 33:639-47.
47. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular Response to mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1998; 24(8):543-7.
48. Lamano Carvalho TL, Teófilo JM, Araújo CACA, Brentegani LG. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of *Ricinus communis* polyurethane resin: Histometric analysis in rats. *Biomed Mater Res*. 1997, 37:449–52.
49. Lu Y, Liu T, Li X, Li H, Pi G. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102:78-84.
50. Maistro EL, Carvalho JCT, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol in vitro* 2004; 18:337–42.

51. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res*. 2003; 82(8):592-6.
52. Martins GR, Oliveira LD, Valera MC, Camargo CHR, Carvalho CAT. Avaliação da capacidade de selamento do polímero da mamona como material retrobturador. *Braz Oral Res*. 2005; 19:49 (resumo).
53. Mastrantonio SS, Ramalho LTO. Resposta do tecido conjuntivo de camundongos ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. *Rev Odontol UNESP* 2003; 32(1):31-7.
54. Medici MC, Fröner IC. A scanning electron microscopic evaluation of different root canal irrigation regimens. *Braz Oral Res*. 2006; 20(3):235-40.
55. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. 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*. 2004; 98:376-9.
56. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement *in vitro*. *J Endod*. 2007; 33:163–6.
57. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomater*. 1999, 20:167-73.

58. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. J Endod. 2005; 31(5):387-91.
59. Murray PE, Windsor LJ, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(6):509-20.
60. Noetzel J, Ozer K, Reissbauer BH, Anil A, Rössler R, Neumann K, Kielbassa AM. Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. Clin Oral Investig. 2006;10(1):77-83.
61. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Rad Biol Medic. 2001; 31(11):1287–1312.
62. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. Annu Rev Genet. 2002; 36:617–56.
63. Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. J Endod. 2006; 32(3):198-201.
64. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. Int Endod J. 2006; 39:429–42.

65. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998, 24(2):91-6.
66. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A et al. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol.* 2005; 21:150-4.
67. Pascon EA, Sousa CJA, Langeland K. Biocompatibility of endodontic materials: cytotoxicity of a polyurethane resin derived from castor beam oil. *Braz Endod J.* 2001; 5:5-12 (abstract).
68. Patel R, Cohenca N. Maturogenesis of a cariously exposed immature permanent tooth using MTA for direct pulp capping: a case report. *Dental Traumatol.* 2006, 22:328-33.
69. Pavan NNO, Moraes IG, Catanzaro-Guimarães AS. Análise da infiltração marginal de quatro cimentos obturadores. *Rev Odontol Bras.* 2003; 18(41):248-52.
70. Perassi FT. Resposta tecidual ao cimento endodôntico Endorez e um cimento experimental derivado do polímero de mamona comparados ao Endofill e Sealapex: estudo morfológico [Tese]. Araraquara: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
71. Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and white MTA. *Int Endod J.* 2003; 36:564-70.

72. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong C-U, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcation. *Oral Surg Oral Med Oral Pat Oral Radiol Endod.* 1995; 79(6):756-63.
73. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *JADA* 1996; 127:1491-4.
74. Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K et al. Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol.* 2008, 82(1):21-8.
75. Rezende TMB, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, Oliveira Mendes ST, Jorge MLR et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J.* 2007; 40:603–11.
76. Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. *In vitro* biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res.* 2005; 19(3):183-7.
77. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101:258-61.

78. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent Mater.* 2008; 24(2):149-64.
79. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroceno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 2005; 47(3):135-8.
80. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LSW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95:483-9.
81. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent Suppl.* 1994; 22:S6-S11.
82. Schmalz G, Schweikl H. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104:292-9.
83. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod.* 2002; 28(3):188-92.
84. Schmalz G. Materials Science: Biological Aspects. *J Dent Res.* 2002; 81(10):660-3.
85. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod.* 2001; 27(4):259-65.

86. Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. *Biomat.* 2000; 21:939-44.
87. Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells *in vitro*. *J Dent Res.* 2004; 83(1):17-21.
88. Schweikl H, Hiller K-A, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomat.* 2005; 26(14):1713-9.
89. Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller K-A, Bolay C, Brockhoff G et al. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomat.* 2005; 26:4111-8.
90. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006; 85(10):870-7.
91. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007; 23(6):688-95.
92. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Medic.* 2000, 28(9):1387–1404.
93. Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia* 2003; 1:32-40.


94. Silveira RL. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48(6):812-22.
95. Sousa CJA, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JCG, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Int Endod J.* 2004; 37:738–48.
96. Souza NJA, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J.* 2006; 39:40–7.
97. Souza Costa CA, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mat.* 2003; 19:739–46.
98. Souza Costa CA, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as a pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36:831–9.
99. Souza-Junior SA, Gonçalves EAL, Catanzaro-Guimarães SA, Castro-Prado MAA. Loss of heterozygosity by mitotic recombination in diploid strain of *Aspergillus nidulans* in response to castor oil plant detergent. *Braz J Biol.* 2004; 64(4):885-90.
100. Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of *N*-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomat.* 2006; 27(9):1803-9.

101. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006, 39:415–422.
102. Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod*. 2001; 27:571-3.
103. Thomas GP, Boyd JB, Soni NN, Palmer JE. Histologic study of pulp capping using chlorhexidine in dogs. *NDAJ* 1995; 46(1):17-20.
104. Thonemann B, Schmalz G. Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. *Eur J Oral Sci*. 2000; 108: 432-41.
105. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*. 1993; 19(12):591-5.
106. Torabinejad J., Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995; 21(7):349-53.
107. Tziafas D, Koliniotou-Koumpia E, Tziafa C, Papadimitriou S. Effects of a new antibacterial adhesive on the repair capacity of the pulp-dentine complex in infected teeth. *Int Endod J*. 2007; 40, 58–66.
108. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantararat J, Korre S. Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102:48-50.

109. Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the three-dimensional culture of dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006; 39:477-83.

110. Witherspoon DE, Small JC, Harris GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies. A case series outcome assessment. *JADA* 2006; 137:610-8.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera – COEPE/Unib


**UNIVERSIDADE
IBIRAPUERA**


RECONHECIDA - PORTARIA MINISTERIAL - MEC Nº 1.190/92 - DOU DE 14/08/92

Parecer COEPE/UNIB nº 91/05

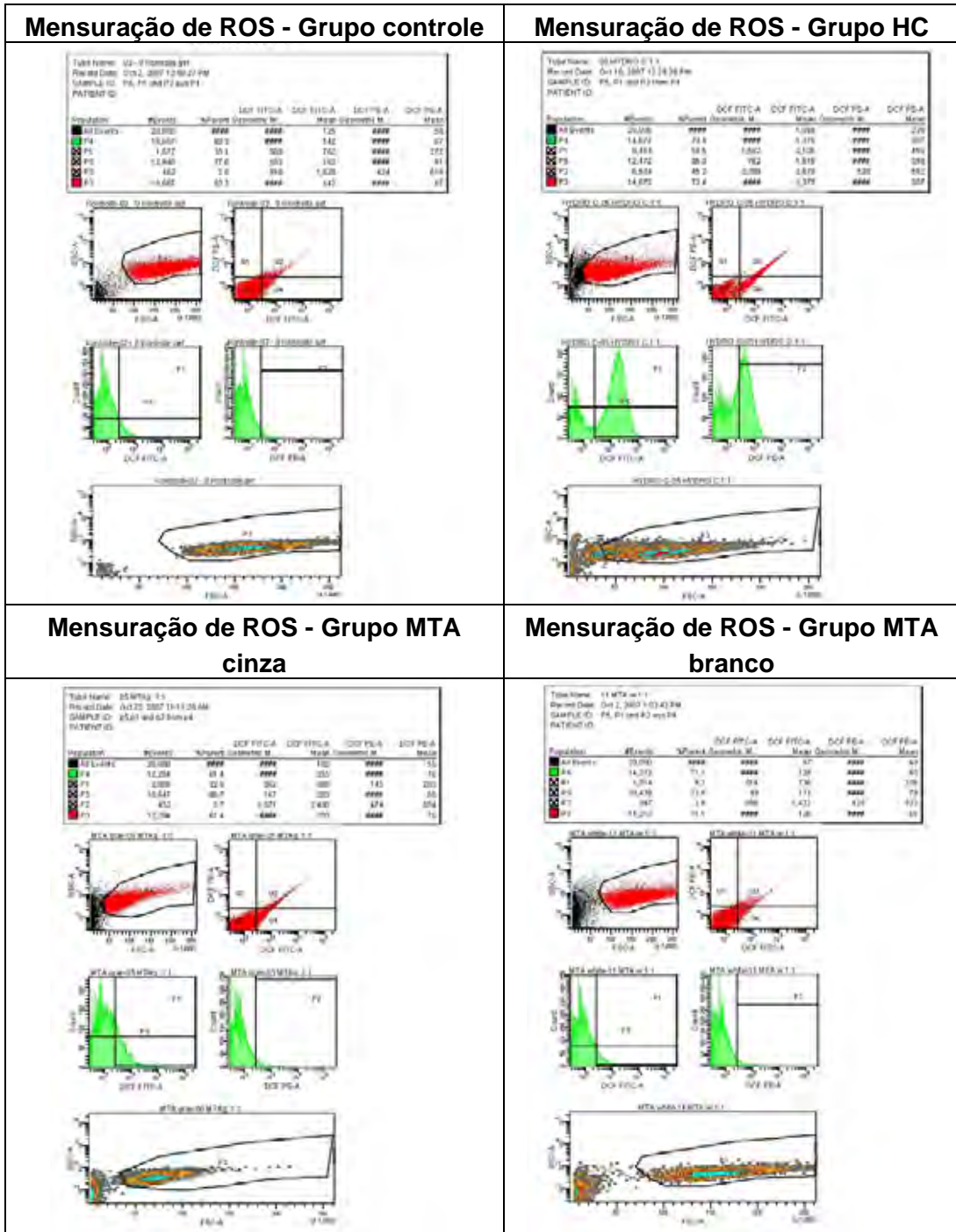
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera - COEPE/UNIB – aprovou o Protocolo de Pesquisa intitulado **“Citotoxicidade de materiais empregados no capeamento pulpar direto e pulpotomia em dentes decíduos. Análise sobre cultura de fibroblastos.”** de responsabilidade do Prof. Sigmar de Mello Rode.

De acordo com a Resolução Nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, o pesquisador responsável fica obrigado a encaminhar relatório circunstanciado a este Comitê imediatamente após a conclusão ou interrupção – temporária ou definitiva - da pesquisa.

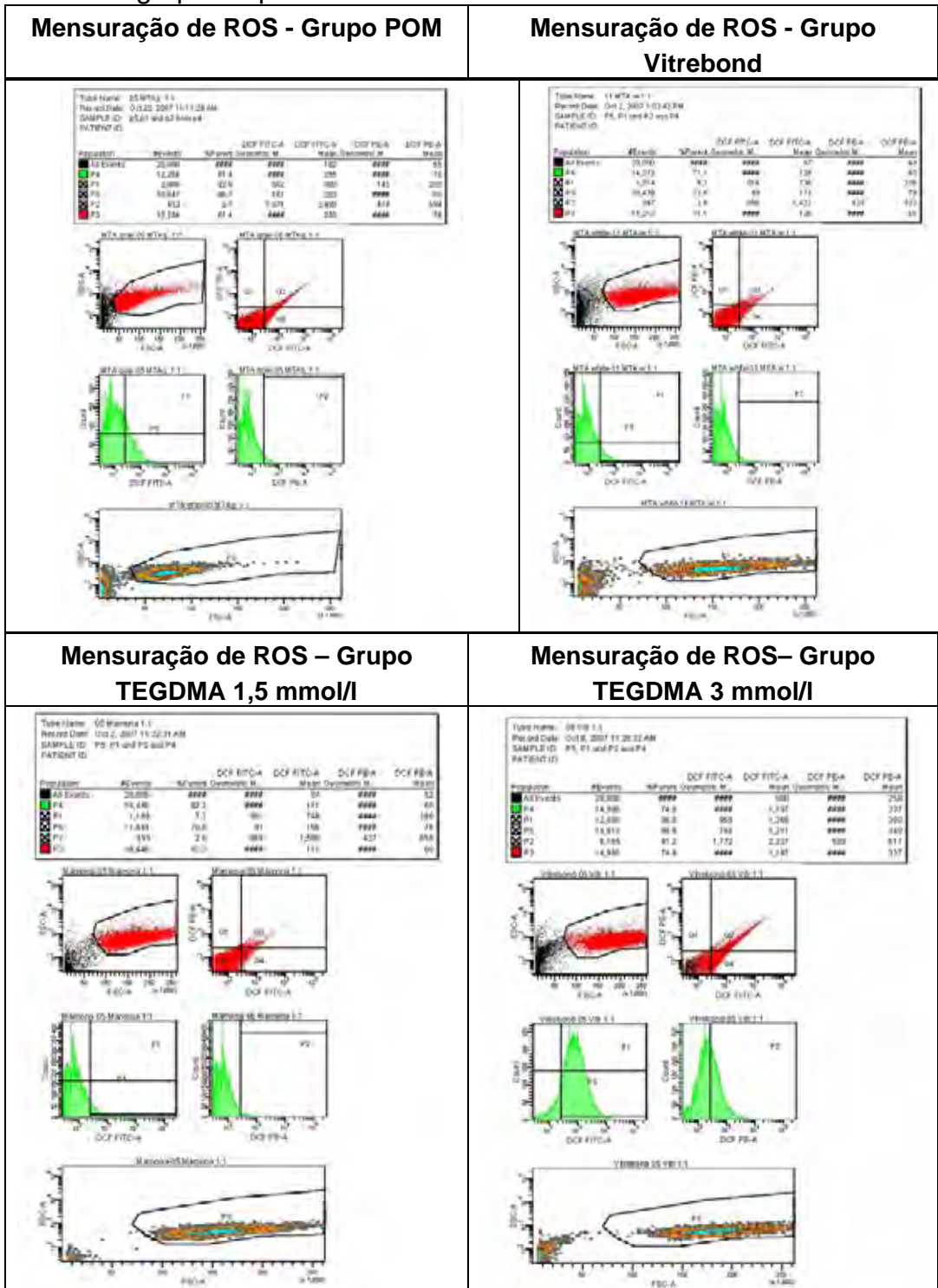
São Paulo, 06 de abril de 2006.


Prof. Silvia Chakkour Nunes
Coordenadora do COEPE/UNIB

Anexo B – Mensuração de produção ROS em tHPC por citometria de fluxo dos grupos experimentais e controles.



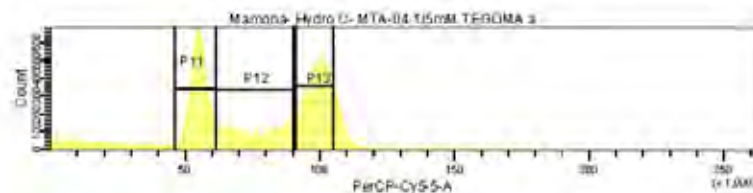
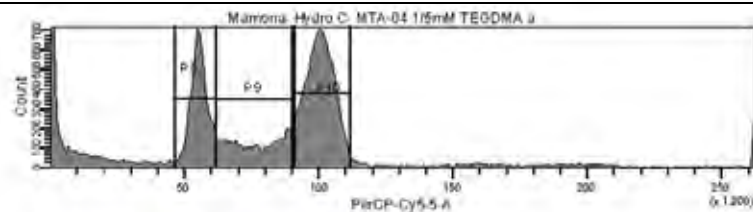
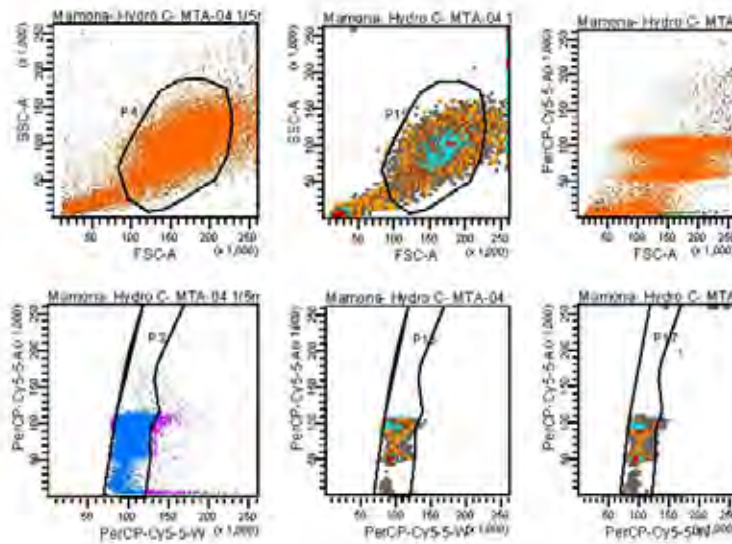
Anexo C – Mensuração de produção ROS em tHPC por citometria de fluxo dos grupos experimentais e controles.



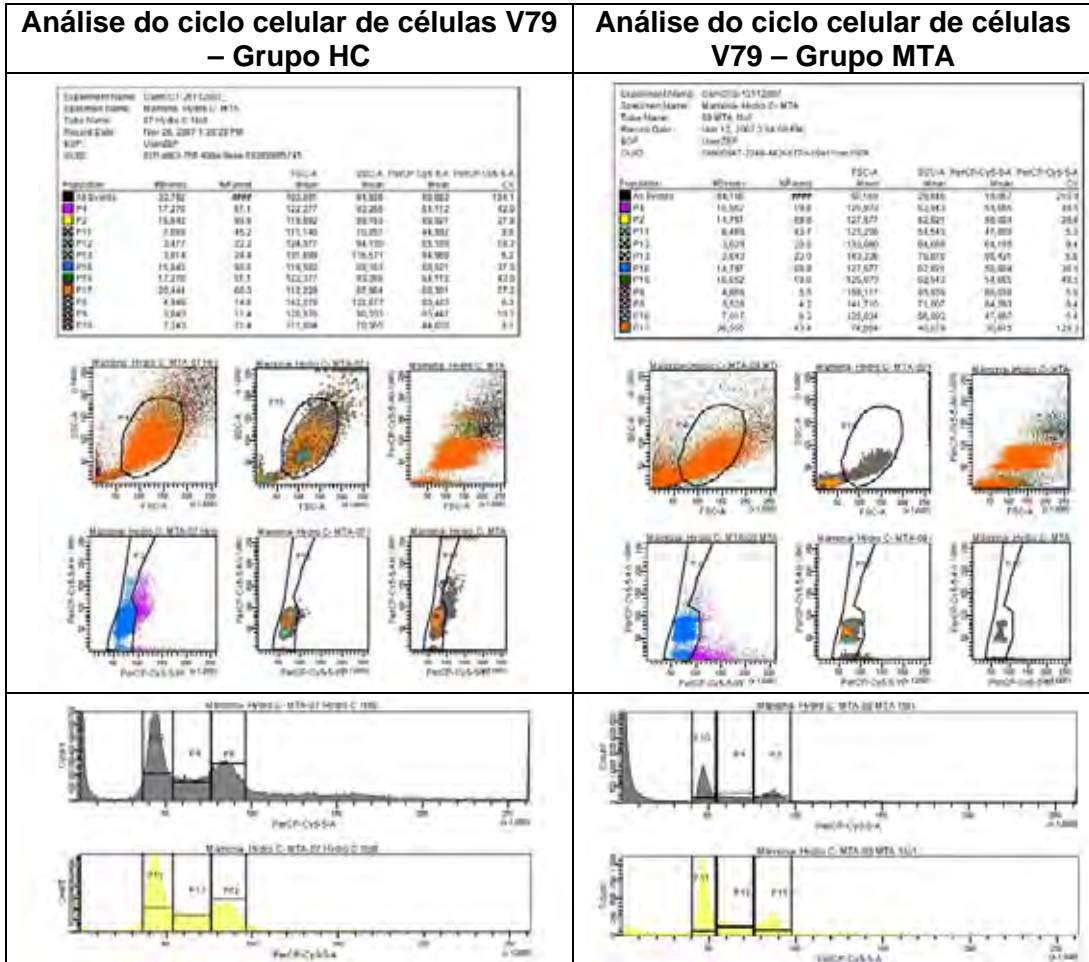
Anexo D- Mensuração da viabilidade celular de células V79 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após tratamento com materiais experimentais e grupo controle.

Análise do ciclo celular de células V79 – Grupo controle

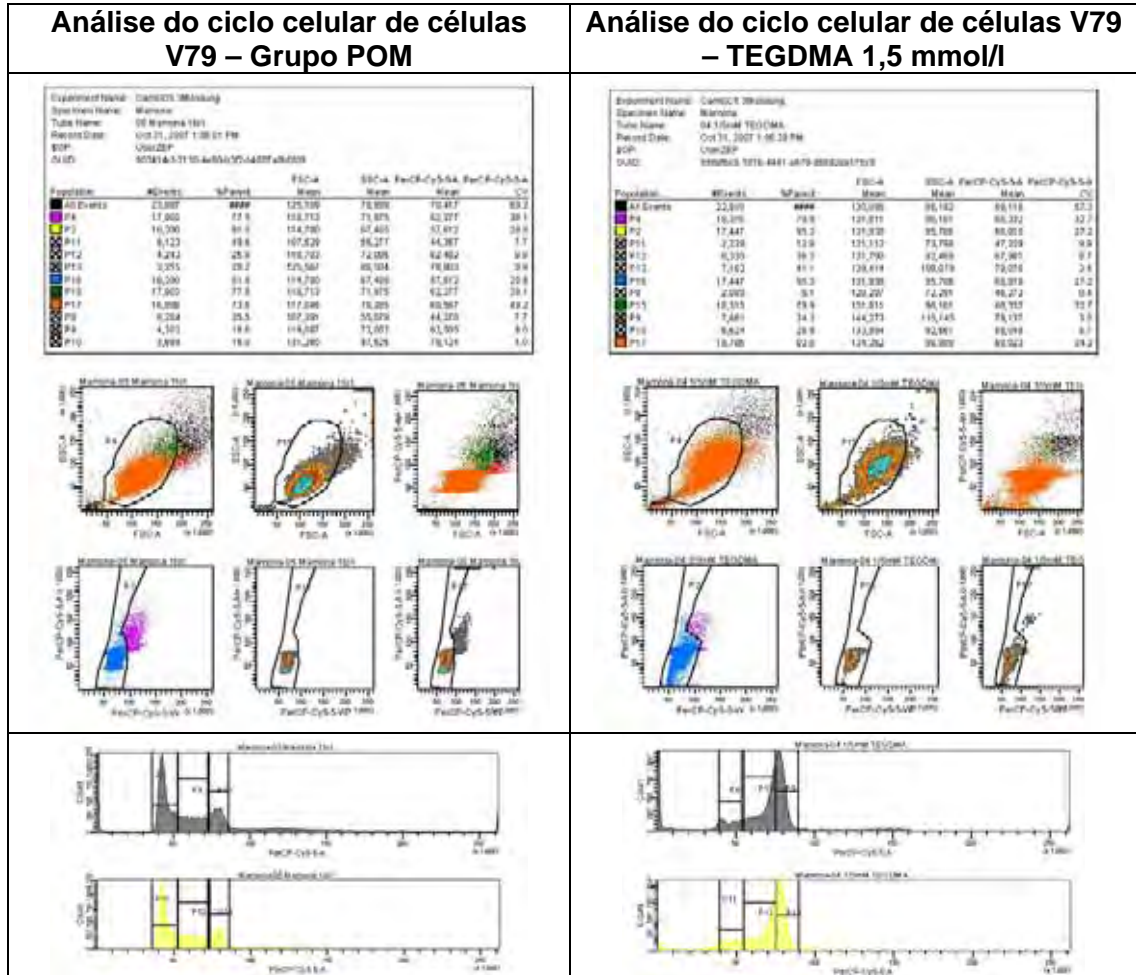
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean	PerCP-Cy5-5-A Mean	PerCP-Cy5-5-A CV
All Events	24,353	###	159,242	94,708	74,980	83.7
P4	16,929	69.5	164,600	95,539	76,078	37.2
P7	15,588	62.1	164,912	95,588	75,894	35.4
P11	4,480	28.7	159,952	81,742	55,438	5.3
P12	2,896	19.2	166,019	91,109	75,976	11.8
P13	5,220	33.5	173,727	112,188	98,083	3.8
P16	16,588	62.1	164,912	95,588	75,894	35.4
P15	16,929	69.5	164,600	95,539	76,078	37.2
P8	4,867	20.0	160,924	81,248	55,483	5.4
P9	3,550	14.6	170,627	91,769	76,201	11.5
P10	9,167	37.6	185,370	115,841	100,520	4.8
P17	20,120	82.6	161,256	92,024	72,733	49.7



Anexo E- Mensuração da viabilidade celular de células V79 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após tratamento com materiais experimentais e grupo controle.



Anexo F- Mensuração da viabilidade celular de células V79 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após tratamento com materiais experimentais e grupo controle.



Camargo SEA. Cytotoxicity and genotoxicity of endodontic materials in two cell lines [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

ABSTRACT

Endodontic materials could release toxic components that may interact with pulp or periapical tissues. The purpose of this study was evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of endodontic materials on transformed human pulp-derived cells (tHPC) and fibroblasts V79. Specimens of calcium hydroxide (Hydro C, Dentsply-Brazil), MTA gray (Angelus-Brazil), MTA white (Angelus-Brazil), and castor oil bean (COB, Poliquil-Brazil) were mixed and subsequently extracted in culture medium (91,6 mm² sample surface/ml) for 24h at 37°C. Vitrebond (3M ESPE) served as a positive control. Exposure of tHPCs to dilutions of the extracts was stopped after 24h, and cell survival was determined photometrically after staining the cells with crystal violet. The generation of reactive oxygen species (ROS) was determined after a 1h exposure of the cells to extracts. ROS were detected by staining the cells with H₂DCF-DA, and fluorescence was measured by flow cytometry (FACS). The genotoxicity as indicated by the formation of micronuclei was determined in V79 cells after a 24h exposure period. The modification of the normal cell cycle was analyzed by FACS. Differences between cell survival rates and fluorescence levels were statistically analyzed (Mann-Whitney-U test, $p \leq 0.05$). The ranking of the cytotoxic effects based on EC50 values was as follows: Vitrebond > Hydro C > MTA gray = MTA white >>> COB. Extract of COB even induced cell proliferation, but Hydro C decrease cell survival in a dose-related manner. ROS production was not detected with any experimental material ($p > 0,05$). Vitrebond increased ROS production about sevenfold ($p < 0,05$). The increase in the number of micronuclei and cell cycle delay in V79 cells were not detected with any experimental material in relation to control group. COB and MTA (gray and white) did not negatively influence cell viability and ROS production. HC presented cytotoxic and a small increase in ROS production on tHPC cells. All experimental materials were not genotoxic and not caused cell cycle delay on V79 cells presenting no mutagenic effects.

KEYWORDS: Citototoxicity, genotoxicity, ROS, cell cicle; calcium hydroxide, MTA, castor oil bean