DANIELLA FERRAZ CERQUEIRA

EFEITO DE FÁRMACOS UTILIZADOS NA TERAPIA ENDODÔNTICA DE DENTES DECÍDUOS: ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E ESTUDO *IN VITRO* DA DISTRIBUÇÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS DA POLPA DENTAL HUMANA

São Paulo

2009

Daniella Ferraz Cerqueira

Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise da citotoxicidade e estudo *in vitro* da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guedes-Pinto

São Paulo

2009

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Cerqueira, Daniella Ferraz
Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise de citotoxicidade e estudo *in vitro* da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana / Daniella Ferraz Cerqueira; orientador Antonio Carlos Guedes-Pinto. -- São Paulo, 2009.

82p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Dentes decíduos – Terapia endodôntica – Fármacos 2. Terapia endodontia – Fármacos – Efeitos 3. Odontopediatria

CDD 617.342

BLACK D272

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cerqueira DF. Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise da citotoxicidade e estudo *in vitro* da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, / /2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

"A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável."

Mahatma Gandhi

Por isso,

"Tenho em mim todos os sonhos do mundo."...

Fernando Pessoa

Aos meus pais, **Waldemar e Sonia**,

Agradeço a Deus por tê-los como pais. Vocês são uma graça divina! Há em o melhor de vocês.

Dedico-lhes este sonho almejado, a vitória conquistada!

Obrigado por acreditarem em mim, obrigado eternamente por tudo!

AMO VOCÊS!!!

Ao meu marido **Rafael**,

Obrigada pela IMENSA paciência, apoio e contribuições para realização deste trabalho. Pelos sábados e domingos que comigo passou no laboratório, por compreender minha ausência em um momento tão especial das nossas vidas: nosso primeiro ano de casados...

Por ser meu amigo, companheiro, por ser meu grande amor!

Te amo!!!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida e por sempre iluminar o meu caminho e a **Nossa Senhora** por me acompanhar diariamente!

Aos meus irmãos Leonardo e Fabiano que estão sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo! As minhas **cunhadas-irmãs Isabela e Fernanda**, pelo carinho, amizade, cumplicidade...

A minha Família, que cresceu durante meu doutorado... Casando-me com o Rafael, casei-me também com uma família maravilhosa. Obrigada **Sérgio, Antônia, Thiago Sérgio Jr. e Lorena** pelo carinho. As minhas tias e tios, primas e primos pelo incentivo incondicional...

Ao Prof. Guedes, um exemplo de mestre e profissional! Agradeço pela confiança neste trabalho e por manter as portas da sua sala sempre abertas para nos ajudar! Com o senhor, agreguei valores humanos e profissionais... Obrigada pelo carinho de sempre!

À Prof^{a}. Márcia, obrigada pelo acolhimento em seu laboratório. Não tenho palavras para agradecer... Sem sua ajuda, hoje não estaria defendendo minha tese de doutorado!

À Prof^{a}. Elaine, muito obrigada pela atenção, carinho e amizade; pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositados!

Aos professores do Departamento de Odontopediatria, Prof^{a}. Salete, Prof^{a}. Célia (*in memoriam*) Prof^{a}. Daniela, Prof^{a}. Márcia, Prof^{a}. Ana Lídia, Prof^{a}. Claudinha, Prof^{a}. Anna Estela, Prof. Marcelo; agradeço os ensinamentos e o carinho; pela partilha de grandes experiências e pelo constante apoio!

Ao Prof. Imparato, nosso querido "chefíssimo". Obrigada por acreditar em mim!!! Agradeço-lhe as múltiplas oportunidades, pelo apoio na docência e pela constante preocupação com toda a equipe!

Ao Prof. Fausto, professor e amigo**,** sempre bem-humorado. Agradeço-lhe o carinho, a amizade e aquelas boas risadas. Muito obrigada pelo engrandecimento científico e profissional!

Aos professores da UFRJ: Dr^{a}. Ivete, Glorinha, Laura, Lucianne, pelo carinho, mesmo que à distância... Saudades!!!

Aos meus amigos da Pós-Graduação, vocês são demais!!! Quando o Prof. Guedes disse que há tempos não se via uma turma tão especial, ele não se enganara... Conviver com vocês é um privilégio!

Ma, bah, que saudades amiga! Nossa cumplicidade iniciava-se nos primeiros dias da Pós... Agradeço de coração por tudo... Na reta final pela ajuda nas estatísticas!

Ba, muito obrigada por TUDO**!!!** Você é uma pessoa muito especial, sempre pronta para ajudar... Tenho um carinho incomensurável por você! Ao Cácio! Você faz parte desta turma. Obrigada! Obrigada!

Mari, minha querida amiga, agora professora doutora da USP (chique, não?!). Obrigada pela convivência e carinho de sempre!

Dri, eterna *partner*... Obrigada pela amizade e carinho... e por ter dividido comigo tantas aflições!

Gabi, querida amiga e companheira. Seu bom-humor para a vida é inquestionável! Você é uma pessoa especial!

Fê, um doce de pessoa! Não sei de quem herdou... risos...

Anna, pelo alto astral!

Isa, pelo constante carinho!

Cássio, o *gentleman* da turma, sempre disponível para ajudar...

A todos os colegas da turma nova de pós-graduação: Jana, Jenny, Chris, Fabi, Lu, Paula, Thiago, Filipe e Rejane. Obrigada pela convivência e carinho com que todos me tratam.

À Rê e Emi, meus eternos agradecimentos! Sem a ajuda de vocês não conseguiria ter chegado hoje aqui! Não imaginam a amizade e carinho que tenho por vocês!

Rê, que dupla hein??? Desde o início, a sintonia foi perfeita!

Emizinha, minha japa querida, com um bom humor inigualável, e sempre me colocando em “foco”...

Aos amigos e colegas da Unicastelo, Ricardinho, Sandra, Felipe, Tuca, Carol, pelo carinho e apoio!

Às minhas amigas, Robertinha, Rita, Maria Clara, Helena, Mariana, Mariane, Gisele, Fernanda, Raquel, Carolina, Juliana, obrigada pela amizade, torcida e incentivo, principalmente, porque compreenderem minha ausência em momentos especiais.

Aos amigos do laboratório de cultivo celular, Leila, Sueli, Caróis, Marina, Carlinha, Niltinho... amigos mesmo. Só quem vivencia esse laboratório entenderá a constante dedicação, trabalho, às vezes, frustrações (contaminações, lento crescimento celular, ausência de marcação das proteínas, risos... nossas lamentações). Lá, tornamo-nos uma família única... prontos para a ajuda múltipla. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Departamento de Odontopediatria, Marize, Fátima, Julio, Clemência, pela convivência diária, prontidão em ajudar, carinho**...**

Ao Departamento de Dentística, pela permissão em utilizar os aparelhos do laboratório. À funcionária Soninha, pela constante ajuda no naquele espaço, indispensável nopreparo dos nossos meios de cultura...

Ao Departamento de Patologia Bucal, pela permissão em utilizar os aparelhos do laboratório. Em especial ao Prof. Fábio Nunes, pela preocupação e constante prontidão para me auxiliar na conclusão desta pesquisa.

Às alunas do Departamento de Patologia Bucal, Fernanda Aluana e Flávia por me auxilarem na captura das imagens da tese. Meu agradecimento muito especial!

A todos os meus alunos de graduação e de especialização, agradeço pela compreensão, sempre que precisei me ausentar sobretudo por ampliarem o meu gostar de aprender a aprender na missão docente, no dia-a-dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o curso e apoio à pesquisa.

"Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida."

William Shakespeare

Cerqueira DF. Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise da citotoxicidade e estudo *in vitro* da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O conhecimento do potencial citotóxico, das reações histológicas e propriedades clínicas é imprescindível para a escolha do material na terapia pulpar de dentes decíduos. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito de fármacos desta terapia quanto à citotoxicidade e distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa humana. Os grupos foram: pasta Guedes-Pinto, pasta Óxido de Zinco e Eugenol (OZE), Vitapex®, Calen® e Calen PMCC®. Os extratos brutos dos fármacos foram testados na concentração 0,2g/ml de meio DMEM/F12 (ASTM, 1992), nas diluições 10, 100 e 1000x. A citotoxicidade foi analisada pela viabilidade (24hs) e sobrevivência celular (24, 48 e 72hs) que se baseou na atividade mitocondrial de fibroblastos da polpa humana (FP5) pelo método de redução do MTT. O grupo controle foi utilizado como 100% de células viáveis. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e teste de Tukey como contraste. O efeito dos fármacos na distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular (fibronectina, tenascina, colágeno I) e de citoesqueleto (vimentina) nas FP5 também foi analisado por imunofluorescência. Os resultados demonstraram que na viabilidade celular, as pastas Guedes-Pinto, pasta OZE, e Calen® foram mais citotóxicas que o grupo controle somente na maior concentração ($p<0,05$), sendo

que esse efeito perdurou para a pasta OZE nas menores concentrações em relação ao grupo controle ($p<0,05$). As diferenças de citotoxicidade entre os fármacos só foram observadas na maior concentração, onde a pasta Guedes-Pinto teve maior efeito tóxico que a pasta Calen®, Calen PMCC® e Vitapex® ($p<0,05$), mas similar à pasta OZE. Na análise da sobrevivência celular em 72hs, todos os grupos apresentaram mesma capacidade proliferativa que o grupo controle em 24 e 48hs ($p>0,05$). As diferenças entre os fármacos foram observadas ao final do tempo experimental quando a Pasta Guedes-Pinto não manteve a mesma capacidade de proliferação celular que o grupo controle na maior e menor concentração ($p<0,05$). Na imunofluorescência, não houve diferença entre os grupos para a distribuição de proteínas da matriz extracelular e citoesqueleto nas FP5. A vimentina, proteína do citoesqueleto de células mesenquimais, encontrou-se distribuída na forma de filamentos ao longo do citoplasma celular. A fibronectina obteve marcação positiva, formando uma rede reticular no citoplasma. A tenascina e colágeno I apareceram como pequenos pontos (vesículas) distribuídos homogeneamente no citoplasma e na região perinuclear. Concluiu-se que, todos os fármacos estudados foram biocompatíveis em relação à citotoxicidade e à distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular e citoesqueleto de fibroblastos da polpa humana.

Palavras-Chave: Biocompatibilidade – Endodontia – Fibroblastos – Matriz extracelular – Dente decíduo

Cerqueira DF. The effect of drugs used in the pulp therapy of deciduous teeth: analysis of cytotoxicity and *in vitro* distribution of extracellular matrix and cytoskeleton proteins from human dental pulp fibroblasts [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

When electing a material to be used in deciduous pulp therapy, it is essential to acquire knowledge regarding the material's potential toxicity, histological reactions and clinical properties. This study aims at analyzing the effect of different drugs used in pulp therapy in relation to their cytotoxicity and *in vitro* protein distribution of extracellular matrix and cytoskeleton from human dental pulp fibroblasts. The groups were: Guedes-Pinto Paste, Zinc Oxide and Eugenol paste (ZOE), Vitapex®, Calen® e Calen PMCC®. The materials were tested using the following concentration: 0.2g/mL of culture medium (DMEM/F12) (ASTM, 1992), diluted in 10x, 100x and 1000x. The cytotoxicity was evaluated by cellular viability (24hs) and survival (24, 48 and 72hs), which was based on mitochondrial activity (MTT reduction test) of human dental pulp fibroblasts (FP5). The control group was considered to have 100% of viable cells. Data were submitted to variance analysis, using Tukey test as contrast. The drugs' effect on *in vitro* expression of extracellular matrix proteins (fibronectin, tenascin, type I collagen) and cytoskeleton (vimentin) from FP5 were also evaluated using immnunofluorescence. The results demonstrated that, concerning cellular viability, Guedes-Pinto paste, ZOE paste, and Calen® were more cytotoxic than the control group only in their highest concentration ($p<0.05$), an effect observed for ZOE paste

in all dilutions ($p<0.05$). Differences regarding cytotoxicity between groups were only observed in the highest concentration where Guedes-Pinto Paste was more toxic than Calen®, Calen PMCC® e Vitapex® ($p<0.05$), but was similar to ZOE paste ($p>0.05$). Cellular survival analysis after 72 h showed that all groups presented a similar proliferative capacity compared to the control group at 24 and 48h ($p>0.05$). Differences were only observed in the end of experimental period (72hs), when Guedes-Pinto paste did not maintain the same proliferative capacity than the control group in its lowest and highest concentrations ($p<0.05$). In immnunofluorescence tests, there was no difference between all groups for extracellular matrix and cytoskeleton proteins distribution from FP5. Vimentin, a protein from the cytoskeleton of mesenchymal cells, was distributed as filaments throughout the cytoplasm. Fibronectin was positively marked, forming a reticular net in the cytoplasm. Tenascin and Collagen I appeared punctually (as vesicles) and were homogeneously distributed in the cytoplasm and peri-nuclear region. It was concluded that all studied drugs investigated were biocompatible regarding cytotoxicity and *in vitro* distribution of extracellular matrix proteins and cytoskeleton proteins from human dental pulp fibroblasts.

.

Key-words: Biocompatibility – Endodontics – Fibroblasts – Extracellular Matrix – Deciduous tooth

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 Pastas Iodoformadas 18

2.2 Pastas de Hidróxido de Cálcio 21

2.3 Pastas de Óxido de Zinco e Eugenol 23

2.4 Polpa Dentária, Matriz Extracelular e Citoesqueleto 24

2.4.1 Fibronectina 26

2.4.2 Colágenos 27

2.4.3 Tenascinas 29

2.4.4 Vimentina 32

3 PROPOSIÇÃO 34

4 MATERIAL E MÉTODOS 35

4.1 Linhagem e cultivo celular 35

4.2 Contagem Celular 37

4.3 Preparação do meio condicionado 39

4.4 Ensaio da Viabilidade e Sobrevivência celular 41

4.4.1 Viabilidade celular 42

4.4.2 Sobrevivência celular 43

4.5 Análise dos resultados 44

4.6 Imunofluorescência 44

5 RESULTADOS 47

5.1 Análise da citotoxicidade 47

5.2 Imunofluorescências 52

6 DISCUSSÃO 57

7 CONCLUSÕES 70

REFERÊNCIAS 71

ANEXO 82

1 INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica em dentes decíduos visa manter a integridade e a saúde dos tecidos dentais e seus adjacentes, utilizando técnicas e/ou medicamentos que permitam a continuidade do seu desenvolvimento até a época de esfoliação, levando-se em consideração as características particulares do ciclo vital desses elementos dentários. Além disso, qualquer conduta endodôntica deve não somente eliminar a dor ou clinicamente impedir a evolução dos processos patológicos, mas também promover a comprovação clínica e radiográfica da remissão dos mesmos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2004; GUEDES-PINTO, 1988; RANLY; GARCIA-GODOY, 2000).

Um material de preenchimento dos canais radiculares de dentes decíduos deve possuir alguns requisitos desejáveis tais como: ser reabsorvível, não provocar dano aos tecidos periapicais e ao germe do permanente, ter propriedades antimicrobianas, promover adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, ser removido facilmente, se necessário, ter radiopacidade e não provocar coloração no dente (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2004; GARCIA-GODOY, 1987; KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA 1992; MASS; ZILBERMAN, 1989; MORTAZAVI; MESBAHI, 2004; NURKO et al., 2000; RIFKIN, 1980). Embora diferentes materiais tenham sido utilizados e preconizados para a obturação de canais radiculares, nenhum preenche completamente todos os requisitos recomendados.

Os guias publicados sobre terapia pulpar em dentes decíduos relatam como possíveis materiais de preenchimento endodôntico, as pastas iodoformadas

(MASS; ZILBERMAN, 1989; MORTAZAVI; MESBAHI, 2004; NURKO; GARCIA-GODOY, 1999; RANLY; GARCIA-GODOY, 2000; RIFKIN, 1980; TCHAOU et al., 1995; TSUI-HSIEN; SHINN-JYH; CHIA-TZE, 2006; WATERHOUSE et al., 2000), pasta de hidróxido de cálcio (BYSTRÖM; CLAESSOM; SUDQUVIST, 1985; MANI et al., 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; MAGALHÃES; ROÇAS, 2007) e de óxido de zinco e eugenol (OZE) (FUKS, 2000; WRIGHT et al., 1994).

Nos procedimentos de pulpotomias em dentes decíduos, uma grande variedade de medicamentos e técnicas é recomendada. O formocresol diluído ainda é o material mais utilizado em diversos países, demonstrando altas taxas de sucesso clínico (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000). No entanto, a *International Agency for Research on Cancer* (2004) classificou o formaldeído como carcinogênico para humanos, deixando aos profissionais a busca de alternativas viáveis para sua substituição.

A *American Academy of Pediatric Dentistry* (2004) propõe o uso do formocresol, sulfato férrico ou eletrocauterização para preservar a polpa radicular. Outras propostas seriam o glutaraldeído, hidróxido de cálcio, laserterapia, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), MTA, Ledermix®, colágeno em gel ou em solução enriquecida (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006) e a pasta Guedes-Pinto (ARAÚJO et al., 1995).

Sendo assim, para a seleção do fármaco ideal na terapia endodôntica de dente decíduos, é necessário o conhecimento sobre o potencial tóxico e das reações que o material pode provocar em níveis histológicos e os mecanismos biológicos pelo qual o material induz a reparação tecidual. Na literatura pesquisada, alguns estudos elucidam a citotoxicidade de fármacos (pastas iodoformadas, pastas de hidróxido de cálcio e de óxido de zinco e eugenol), entretanto, poucos são trabalhos

que ilustram a ação destes sobre as proteínas da matriz extracelular da polpa dentária, que possuem importante papel na morfogênese embrionária, diferenciação celular e ação reparadora da polpa, essenciais para a formação dos tecidos dentários e ósseos (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994; LESOT; OSMAN; RUCH, 1981; LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; RUCH, 1985; THESLEFF; VAINIO; JALKALEN, 1989).

Diante do exposto, há grande interesse em elucidar a ação de alguns fármacos quanto à citotoxicidade e distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental, o propósito do presente trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o intuito de facilitar a compreensão dos assuntos abordados, a revisão de literatura foi dividida nas seções: Pastas Iodoformadas; Pastas de Hidróxido de Cálcio; Pastas de Óxido de Zinco e Eugenol e Proteínas da Matriz Extracelular e Citoesqueleto.

2.1 Pastas Iodoformadas

As pastas iodoformadas têm sido recomendadas como material de eleição para o tratamento endodôntico, pois cumprem grande parte das características requisitadas. Dentre elas encontram-se: Kri 1®, Vitapex®, pasta Maisto e a pasta Guedes-Pinto (GUEDES-PINTO; PAIVA; BOZZOLA, 1981; GARCIA-GODOY, 1987; MASS; ZILBERMAN, 1989; MORTAZAVI; MESBAHI, 2004; NURKO; GARCIA-GODOY, 1999; RIFKIN, 1980), sendo que as preparações comerciais como a Kri® e a Vitapex® têm demonstrado resultados prósperos (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006).

A Vitapex® (Neo Dental Chemical Products Co., Tokyo, Japan) tem sido recomendada como o material de preenchimento radicular em dentes decíduos mais próximo do ideal (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000; KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). Dentre suas propriedades encontram-se o baixo potencial citotóxico (TSUI-HSIEN; SHINN-JYH; CHIA-TZE, 2006) e a baixa atividade

antimicrobiano (AMORIM et al., 2006; TCHAOU et al., 1995). Outras características desse material, como por exemplo, a ausência de efeitos tóxicos e deletérios ao sucessor permanente, associadas a sua radiopacidade e boa reabsorção, levaram muitos autores a considerá-lo como um material quase ideal para obturação radicular em dentes decíduos (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006).

Os estudos clínicos onde dentes decíduos com necrose pulpar foram tratados com a Vitapex® mostraram elevados índices de sucesso (NURKO; GARCIA-GODOY, 1999) e melhores resultados comparados ao tratamento com OZE (MORTAZAVI; MESBAHI, 2004).

A pasta Guedes-Pinto (PGP) foi proposta em 1981, quando se realizou um estudo sobre a ação de uma pasta composta por Rifocort®, paramonoclorofenol canforado e iodofórmio (Quadro 2.1), na terapia endodôntica de 45 dentes decíduos com polpa mortificada (GUEDES-PINTO; PAIVA; BOZZOLA, 1981). Os resultados observados foram ausência de dor pós-operatória em todos os casos e ausência de fístula em sete dias para pacientes que a apresentavam. Ao exame radiográfico, executado durante um ano com intervalos semestrais, constataram-se reabsorção da pasta quando do seu extravasamento para locais de lise óssea e neoformação óssea em aproximadamente seis meses após reabsorção.

Componentes	Composição	Aspecto físico	Função
Rifocort®	(por cada grama) *acetato do prednisolona. (5mg) - antiinflamatório corticosteróide * sal do sódico de rifamicina 1,5mg - antibiótico *propilenoglicol- veículo *macrogol (polietilenoglicol) – veículo	Pomada	Antiinflamatório Antibiótico
Paraclorofenol-canforado	(proporção 3:7) * paraclorofenol de 30% * cânfora de 70%	Líquido	Antimicrobiano Analgésico
Iodofórmio	* tri-iodo metano puro.	Pó	Antimicrobiano

Quadro 2.1- Componentes da pasta Guedes-Pinto, proposta em 1981

Araújo et al. (1995) compararam a PGP com o formocresol em pulpotomias de 80 molares decíduos. Os resultados com PGP foram superiores: 85% de sucesso clínico e radiográfico em 24 meses contra 67% para os dentes tratados com formocresol. Outros estudos também apontaram resultados satisfatórios para o emprego da PGP para pulpotomias (BENGTSON; BENGTSON, 1994; CASTRO, 1998).

Uma revisão compilou 26 anos de estudo da Pasta Guedes-Pinto (PGP) sobre sua citotoxidade, avaliações histopatológicas e microbiológicas, e estudos clínicos. Os resultados apresentados demonstraram que em todos os testes iniciais, secundários e pré-clínicos, a PGP mostrou qualidade superior, quando comparado com outros materiais utilizados em endodontia para dentes decíduos (CERQUEIRA et al., 2008). Além disso, a PGP é a pasta mais utilizada em grande parte das

Faculdades de Odontologia do Brasil (BRUSCO et al., 2002; KRAMER; FARACO-JUNIOR, FELDENS, 2000), tanto para pulpectomia como para pulpotomia.

2.2 Pastas de Hidróxido de Cálcio

O hidróxido de cálcio (HC) é uma base forte, derivado do sal carbonato de cálcio encontrado na natureza, que apresenta baixa solubilidade à água, elevado pH, sendo insolúvel no álcool. Suas propriedades derivam de sua dissociação em íons cálcio (Ca^{++}) e hidroxila (OH^{-}), e a ação destes íons sobre os tecidos e as bactérias explica seu potencial biológico e antimicrobiano (ESTRELA; BAMMANN, 1999). Tais propriedades são descritas como: biocompatibilidade, a ação antibacteriana, através da inibição enzimática e alterações na parede celular; a ação antiinflamatória e a sua atividade biológica responsável pela ativação da enzima tecidual fosfatase alcalina, indutora da formação de tecido ósseo mineralizado e, conseqüentemente, contribuinte para o processo de reparo (ESTRELA; BAMMANN, 1999; SIQUEIRA JUNIOR; LOPES, 1997).

Em 1962, Doyle, McDonald E Mitchel propuseram o uso do hidróxido de cálcio como alternativa ao formocresol em pulpotomias de dentes decíduos. Desde então, vários estudos em animais foram conduzidos para avaliar a resposta tecidual ao hidróxido de cálcio, porém a diversidade de metodologias empregadas dificulta comparações. O consenso de resultados aponta que o uso de hidróxido de cálcio acarreta na formação completa ou incompleta de uma ponte de dentina formada sobre a polpa amputada com morfologia similar à osteodentina, sendo encontradas

também uma camada fibrosa e polpa vital abaixo dessa ponte calcificada. Sendo assim, o uso do hidróxido de cálcio pode promover tanto a preservação e/ou mineralização da polpa dentária (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006).

Os dados publicados sobre o grau de sucesso clínico do hidróxido de cálcio para pulpotomias em humanos apresentam grandes variações, encontrando-se taxas de sucesso de 12 a 70% (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006). Doyle et al. encontraram em seu estudo clínico que a uso de HC estava associado à formação de ponte de dentina e à total reparação da polpa amputada. No entanto, os casos de fracasso estavam sempre associados a reabsorções internas.

Consequentemente, por um tempo, o hidróxido de cálcio foi eleito como o material alternativo ao formocresol em pulpotomias, porém, observou-se com grande freqüência que ele estimulava a reabsorção interna ao invés da formação da ponte de dentina (MAGNUSSON, 1970). Essa reabsorção deve-se principalmente à presença de coágulo sangüíneo que interfere na ação da substância sobre a polpa dentária, e não do hidróxido de cálcio por si próprio (SCHR□EDER, 1978).

Em pulpectomias de dentes decíduos, o hidróxido de cálcio também pode ser indicado em razão de seu efeito antibacteriano, por ser de fácil reabsorção e por não causar reação de corpo estranho (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006). Entretanto, para Kubota, Golden e Penugonda (1992), ele pode causar reabsorção interna, não sendo indicado para pulpectomias.

Os resultados clínicos apontam alta taxa de sucesso num período superior a seis meses, observando-se a depleção do material em alguns canais, fato clinicamente irrelevante (MANI et al., 2000). O alto índice de sucesso clínico do hidróxido de cálcio está na sua associação com o iodofórmio, ou seja, a pasta

Vitapex© (NURKO; GARCIA-GODOY, 1999; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006).

2.3 Pastas de Óxido de Zinco e Eugenol

A pasta de óxido de zinco e eugenol (OZE) para obturação de canais radiculares de dentes decíduos foi descrito por Sweet em 1930, sendo desde então, o material indicado por muitos autores (KOPEL, 1970; KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992; RIFKIN, 1980; YACOBI et al., 1991). Apesar das altas taxas de sucesso da terapia com OZE (68 a 89%) (HOLAN; FUKS, 1993), ele não preenche os requisitos desejáveis do material ideal para obturação dos canais radiculares de dentes decíduos. Em 1967, Erausquin e Muruzabal já relataram o poder irritante da pasta OZE aos tecidos periapicais de ratos ao produzir necrose ao tecido ósseo e cemento.

A pasta OZE é descrita como reabsorvível, porém observa-se sua retenção mesmo depois da esfoliação do dente obturado (SPEDDING, 1985). Sadrian e Coll, em 1993, relataram que após uma média de 91 meses da realização do tratamento endodôntico, observou-se a retenção da pasta OZE em 49,4% dos dentes mesmo após a sua perda. Esta retenção pode causar desvio ou atraso na erupção do sucessor permanente como descrito em dois casos clínicos por Jerrel e Ronk (1982). Para Ranly e Garcia-Godoy (1991), a explicação para tal consiste na discrepância existente entre o tempo que pasta necessita para ser reabsorvida e o menor tempo que as raízes dos dentes decíduos nesse processo.

O poder antimicrobiano da pasta OZE, geralmente, está relacionado à quantidade de eugenol incorporada à mistura, ou à adição de outros fármacos com formocresol ou paramonoclorofenol canforado (TCHAOU et al., 1995; WRIGHT et al., 1994). Tal propriedade da pasta apresenta um comportamento dependo do material ao qual ela é comparada ou ao tipo de metodologia empregada para a avaliação. Sendo assim, há estudos que apontam atividade antimicrobiana semelhante à Pasta Guedes-Pinto (AMORIM et al., 2006; BONOW; GUEDES-PINTO; BAMMANN, 1996) e superior à Vitapex® e às pastas de hidróxido de cálcio (BONOW; BONOW; GUEDES-PINTO; BAMMANN, 1996; TCHAOU et al., 1995) e nenhuma atividade (PIVA; FARACO-JUNIOR; ESTRELA, 2008).

2.4 Polpa Dentária, Matriz Extracelular e Citoesqueleto

A polpa dentária é constituída por tecido conjuntivo frouxo de característica singular pela sua organização e localização, sendo formado, histologicamente, por células e matriz extracelular. Os fibroblastos são as principais células encontradas na porção central da polpa e apresentam aspecto fusiforme com núcleo central e ovóide. Seus longos prolongamentos e citoplasma com típicas organelas de síntese e secreção refletem sua capacidade de renovação e produção dos elementos da matriz extracelular. Em toda a extensão da polpa, os fibroblastos encontram-se distribuídos regularmente, podendo ser encontrados em diversos estados funcionais: ativos ou em repouso (fibrócitos) (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Outros tipos celulares também são encontrados na polpa dentária como:

células mesenquimais indiferenciadas, vasculares (sanguíneas e linfáticas), endoteliais, perivasculares, neurais, odontoblastos, macrófagos e linfócitos T (GOLDEBERG; LASFARGUES, 1995; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

A matriz extracelular da polpa é constituída por elementos fibrosos e substância fundamental, composta abundantemente por proteoglicanas, glicosaminas, glicoproteínas e água, caracterizando-se como um gel que embebe esses elementos celulares e fibrilares (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). O colágeno é o elemento fibroso mais abundante, presente em toda a polpa, porém sem distribuição uniforme. A maior parte das fibrilas colágenas é do tipo I, no entanto, fibrilas colágenas do tipo III, correspondentes às fibrilas reticulares, também foram detectadas. As outras principais classes de macromoléculas componentes da matriz extracelular da polpa são: proteínas não colagênicas (fibronectina, tenascina, osteonectina, sialoproteína, osteocalcina); proteoglicanas (ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana), e fosfolipídios (LINDE, 1985; GOLDEBERG; LASFARGUES, 1995; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

Esta matriz possui um importante papel na morfogênese embrionária e diferenciação celular, considerada essencial para a formação dos tecidos dentários (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994; LESOT; OSMAN; RUCH, 1981; LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; RUCH, 1985; THESLEFF; VAINIO; JALKALEN, 1989), além de funcionar como um arcabouço físico para a manutenção do tecido pulpar (VAN AMERONGEN; LEMMENS; TONINO, 1983).

2.4.1 Fibronectina

As fibronectinas são uma classe de glicoproteínas adesivas da matriz extracelular, de alto peso molecular (220Kd), e constituídas de duas cadeias de polipeptídeos unidas por pontes dissulfídicas (HYNES; YAMADA, 1982). A fibronectina não é exclusiva do tecido conjuntivo, pois é também formada em células neurológicas e epiteliais indiferenciadas, além de ser componente da matriz extracelular de células e constituinte de membranas basais (YAMADA; OLDEN, 1978).

A fibronectina está envolvida em uma grande variedade de propriedades celulares como: adesão celular, morfologia, organização do citoesqueleto, migração, diferenciação, transformação oncogênica, fagocitose e hemoestase (HYNES; YAMADA, 1982). A fibronectina também assume um importante papel na diferenciação dos odontoblastos.

A distribuição da fibronectina durante a odontogênese vem sendo demonstrada em diversos estudos (LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; MARTINEZ et al., 2000; VAN AMERONGEN; LEMMENS; TONINO, 1984; YOSHIBA et al., 1994). Durante esse processo, ela é considerada uma glicoproteína mediadora de adesão entre células e matriz extracelular, determinando a polarização das células da papila dentária, induzindo juntamente com a membrana basal, a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos (LESOT; OSMAN; RUCH, 1981; YOSHIBA et al., 1994), função semelhante quando ocorre a formação de dentina reparativa (YOSHIBA et al., 1996).

Estudos em dentes humanos também demonstraram a marcação da fibronectina na pré-dentina durante o estágio inicial da dentinogênese, no entanto a mesma se mostrava ausente nas fases mais tardias, assim como na dentina mineralizada (LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; YOSHIBA et al., 1994). Outras pesquisas evidenciaram a distribuição de fibronectina na polpa dentária, sendo mais fortemente expressa na interface tecido mineralizado e não-mineralizado (LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; MARTINEZ et al., 2000; VAN AMERONGEN; LEMMENS; TONINO, 1984). Entretanto, Martinez et al. (2000) não observaram a expressão de fibronectina e tenascina nas polpas dentárias com processo inflamatório.

2.4.2 Colágenos

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas sintetizadas por células do tecido conjuntivo (LINDE, 1985). O colágeno tipo I é a forma mais abundante, sendo encontrado nos ossos, dentina, tendões, pele e muitos outros tecidos. O tipo II, normalmente, ocorre em cartilagens, enquanto o tipo III, usualmente, está associado ao tipo I (LECHNER; KALNITSKY, 1981). Estes três tipos são chamados de colágenos intersticiais, pois formam estruturas fibrilares no espaço intercelular (LINDE, 1985). O colágeno tipo IV é exclusivo da membrana basal (LECHNER; KALNITSKY, 1981) e tipo V é um colágeno estromal e pericelular com possíveis propriedades ligantes (MARTINEZ-HERNANDEZ; AMENTA, 1983).

As proteínas colágenas são os maiores constituintes (37%) da matriz extracelular da polpa dentária, sendo encontrado colágenos tipo I e tipo III (43 a 45%) (LECHNER; KALNITSKY, 1981; VAN-AMERONGEN; LEMMENS; TONINO, 1983). Elas são produzidas pelos fibroblastos pulpares que sintetizam a molécula de pró-colágeno que fica armazenada no complexo de Golgi, passando, sob a ação da enzima colagenase, como moléculas de colágeno para o espaço intercelular (LINDE, 1985).

Lechner e Kalnitsky (1981), ao estudarem os tipos de colágenos presentes na polpa dentária humana e a sua distribuição em relação à dentinogênese, relataram uma diminuição na concentração de colágeno com aumento da maturidade dentária, sendo que as fibras tipo III permaneceram constantes (45%) em todos os estágios (embrionário jovem e maduro). Nielsen, Bentley e Marshall (1983) e Hillmann e Geursten (1997) também observaram diminuição dessa proteína com o processo eruptivo dos dentes, que permanece inalterado com a senilidade do tecido pulpar, havendo somente uma mudança morfológica do tecido onde as fibras delgadas são substituídas por fibras mais espessas, agregadas e condensadas.

As proteínas colágenas também constituem o maior componente orgânico da matriz da dentina (80 a 90%), sendo encontrado somente o tipo I diferentemente do tecido pulpar (SCOTT; VEIS, 1986). Entretanto, fibrilas colágenas do tipo III, correspondentes às fibrilas reticulares, também já foram detectadas.

Em 1994, Garbarsch et al. avaliaram a distribuição dos colágenos I, III e IV, tenascina e fibronectina nas matrizes de esmalte, dentina, pré-dentina e papila de germes dentários pela técnica de imunohistoquímica. Observou-se que apenas o colágeno tipo I foi detectado na dentina peritubular. A tenascina, fibronectina e

colágeno tipo I foram encontrados na pré-dentina nos estágios inicias da dentinogênese, sendo que essas proteínas, e, em adição o colágeno III, também estavam presentes na papila dental. O colágeno tipo IV foi detectado principalmente na membrana basal dos vasos sanguíneos. Hillmann e Geursten (1997) encontraram resultados semelhantes utilizando a imunofluorescência indireta e luz polarizada para colágeno I, III e IV. Já os colágenos V e VI formaram uma malha de finas microfibrilas no tecido pulpar, aparecendo em profusão na camada subodontoblástica.

Semelhantemente à dentina normal, a dentina reparativa é formada principalmente de colágeno I. A pré-dentina relacionada à dentina reparativa expressa colágeno I e III e fibronectina, enquanto a matriz da pré-dentina não relacionada a processos patológicos é composta somente por colágeno I (KARJALAINEN et al., 1986).

2.4.3 Tenascinas

A tenascina é uma glicoproteína oligomérica multifuncional da matriz extracelular (SPRING; BECK; CHIQUET-EHRISMANN, 1989), possuindo outras denominações como antígeno mesenquimal da matriz extracelular do glioma – GMEM (BOURDON et al., 1983), antígeno miotendioso (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1986), dentre outras.

Em dentes embrionários, assim como nas glândulas mamárias e folículo capilar, a tenascina está presente no denso e órgão-específico mesênquima

cercando o botão epitelial invaginado, e tem como função as interações teciduais que governam o controle inicial do desenvolvimento embrionário (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1986). Esta proteína extracelular também é sintetizada em locais e tempos específicos durante desenvolvimento embrionário, porém possui presença restrita nos tecidos adultos, além de ser expressa em uma variedade de neoplasias malignas e processos de cicatrização (BOURDON et al., 1983; MACKIE; THESLLEF; CHIQUET-EHRISMANN, 1987).

Na literatura, três tipos de tenascinas são descritos: tenascina-C (presente em inúmeros tecidos de desenvolvimento, cicatriciais e tumorais), tenascina-R (específica no sistema nervoso central e periférico, principalmente na fase embrionária) e tenascina-X (mais comum nas células musculares esquelética e cardíaca) (CHIQUET-EHRISMANN, 1995).

A expressão da tenascina é célula tipo-específica, podendo ser induzida por fibroblastos e células gliais com envolvimento de fatores de crescimento. Os esforços mecânicos também são capazes de induzir a expressão de tenascina (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994; CHIQUET et al., 1996).

As células que produzem tenascina durante odontogênese foram determinadas por Tucker, Moiseiwitsch e Lauder (1993) ao utilizarem germes dentários de ratos e sondas de DNA pela técnica de hibridização *in situ*. Os resultados apontaram que grande parte da tenascina encontrada em dentes em desenvolvimento parece ser sintetizada por pré-odontoblastos e epitélio interno do esmalte, populações celulares responsáveis pela produção de matriz mineralizante.

Inúmeras funções são atribuídas à tenascina como: ação anti-adesiva da tensacina quando em conjunto com a fibronectina, implicando na mediação da migração celular durante embriogênese, reduzindo a adesão da fibronectina

(CHIQUET-EHRISMANN et al., 1988); ação imunossupressora por inibir ativação dos linfócitos T (RUEGG; CHIQUET-EHRISMANN; ALKANN, 1989).

Thesleff et al. (1987) avaliaram as mudanças na distribuição da tenascina durante o desenvolvimento dentário em animais com a técnica de imunohistoquímica. Os resultados indicaram que a tenascina é expressa pela linhagem de células mesenquimais durante a ontogênese dental. A intensidade da coloração para tenascina era temporariamente reduzida durante estágio de capuz da morfogênese dentária, e aumentava durante fase de campânula, estando acumulada na polpa mesmo após desenvolvimento completo da coroa e erupção. No momento da diferenciação dos odontoblastos, a tenascina também estava presente na membrana basal, porém as células da papila cessavam sua expressão, estando totalmente ausente na dentina. Os autores sugeriram então que, a expressão de tenascina por células mesenquimais dentais está associada com a capacidade dessas células em diferenciar-se em células formadoras de tecidos duros. Esta glicoproteína da matriz extracelular possui então, uma importante função na morfogênese dentária e interação célula-matriz e diferenciação dos odontoblastos.

Outras duas funções foram associadas à tenascina em um estudo que analisou sua expressão em terceiros molares não erupcionados de adolescentes (LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991). Os resultados apontaram que a tenascina pode estar funcionalmente associada a esforços mecânicos, uma vez que ela esteve acumulada na interface de tecidos mineralizados e não-mineralizados. A co-expressão da tenascina e fibronectina na polpa dental, zona cementogênica e na superfície do osso alveolar também reflete a contribuição dessas glicoproteínas da matriz na regulação da estrutura tecidual e deposição de matrizes mineralizadas.

Martinez et al. (2000) não observaram a expressão de fibronectina e tenascina nas polpas dentárias com processo inflamatório, no entanto verificaram um acúmulo de tenascina na periferia do tecido pulpar que pode estar associado à formação de dentina secundária, mediando então, a migração e diferenciação celular. Em adição, a tenascina participa dos processos iniciais de osteogênese e condrogênese, possuindo um papel importante na diferenciação de células mesenquimais formadoras de tecidos duros (MACKIE; THESLEFF; CHIQUET-EHRISMANN, 1987).

2.4.4 Vimentina

Os filamentos intermediários, componentes do citoesqueleto celular, são uma grande família multigênica de proteínas fibrosas que incluem as citoqueratinas, características das células epiteliais (MOLL et al., 1982), e a vimentina, típica de células de origem mesenquimal (STEINERT; ROOP, 1988).

A vimentina é o maior filamento intermediário presente em células fibrobroblásticas (LAZARIDES, 1982), sendo considerado um dos componentes insolúveis do espaço intracelular, assumindo então, importante função estrutural. Ela apresenta-se no citoplasma celular formando uma rede de filamentos disposta de maneira ondulada (do latim *vimentus*) possibilitando também a manutenção do arcabouço nuclear (LAZARIDES, 1980).

A imunolocalização da vimentina demonstrou sua presença em fibroblastos do ligamento periodontal e polpa dental, em odontoblastos e nos

fibroblastos da papila e folículo dental durante a odontogênese (LESOT et al., 1982; LOMBARDI et al., 1992; PELLISSIER et al., 1990).

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade de fármacos da terapia endodontia de dentes decíduos (Pasta Guedes-Pinto, Vitapex®, Pasta de óxido de Zinco e Eugenol, Calen® e Calen PMCC®) em dois testes:

1) Análise da citotoxicidade fibroblastos de polpa dental humana pelos ensaios de viabilidade e de crescimento celular;

2) Análise da distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular (fibronectina, tenascina, colágeno I e osteonectina) e do citoesqueleto (vimentina) de fibroblastos de polpa dental humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, obtendo sua aprovação, sob o número de protocolo 130/07 (ANEXO A).

A pesquisa foi realizada em duas fases: análise da citotoxicidade de fármacos utilizadas na terapia endodôntica de dentes decíduos e teste de imunofluorescência para verificar a expressão de proteínas da matriz extracelular de fibroblastos de polpa humana após exposição às mesmas.

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados Laboratório de Pesquisa Básica Professor Edmir e no Laboratório de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

4.1 Linhagem e cultivo celular

Para a realização dos testes de citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos de polpa humana dental (FP5) (Figura 4.1), linhagem que se encontra congelada no Laboratório de Pesquisa Básica Professor Edmir Matson FO/USP. Tal linhagem foi obtida pelo cultivo primário de tecido pulpar de germe dentário em estado inicial de formação radicular pela técnica de *explant.*

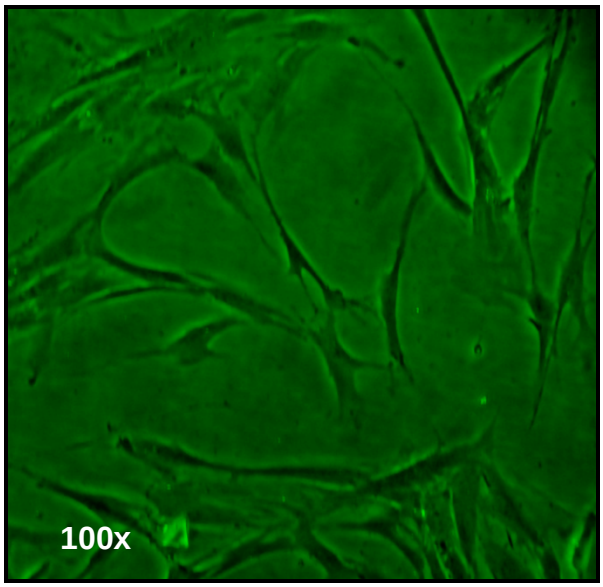

Figura 4.1- Fotomicrografias de contraste de fase da linhagem de fibroblastos da polpa humana (FP5)

Um tubo criogênico contendo as células congeladas (FP5) foi descongelado, por 60 segundos, em banho de água a 37ºC. Para remover a substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido, DMSO), o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura centrifugado a 300 g por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células resultantes ressuspendido em 1mL de meio de cultura fresco DMEM/F12 (meio *Eagle* modificado por Dulbeco / Ham's F12, 1:1, Gibco, Grand Island, NY). A suspensão de células foi então transferida para um frasco plástico de cultivo celular de 25 cm^2 de área cultivável contendo 5mL de meio de DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco), sendo mantidas em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono a 37ºC.

Quando as células ocuparam 70% da área cultivável do frasco, ou seja, atingiram a subconfluência, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do

frasco foi removido e reservado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBSA), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 2mL de solução de tripsina a 0,25% (Cultilab, Campinas, Brasil) durante 3 minutos a 37ºC. A tripsina foi então inativada com o meio anteriormente reservado e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 330g por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de células resultantes da centrifugação foi ressuspendido em 1mL de DMEM/F12 fresco. Para perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram replaqueadas em frascos de 25cm^2 contendo 25mL de meio e mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37ºC, procedimento que deu origem a novas passagens de cultura.

Para a manutenção da viabilidade celular, todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar a fim de manter da esterilidade dos materiais e substâncias utilizadas para cultivos celulares. A monitorizarão do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas utilizando-se microscópio de fase invertida, trocando-se o meio de cultura a cada 2 ou 3 dias.

4.2 Contagem Celular

As células subcultivadas em frascos de 20 mL, obtidas pela perpetuação da linhagem celular, foram tripsinizadas e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspendido em 1mL de PBSA. Uma alíquota de 100µl dessa suspensão foi transferida a um *Eppendorf* contendo 800µL e 100µl de Azul de

Trypan. Cada uma das duas câmaras do hemocitômetro (Câmara de Neubauer) (Figura 4.2) recebeu 15µl dessa nova suspensão e levada ao microscópio de luz invertido para realizar a contagem celular, utilizando-se, somente, o quadrado central de cada câmara. As células mortas eram coradas em azul, devido à penetração do Azul de *Trypan* pelas membranas celulares danificadas (Figura 4.2), e foram excluídas da contagem. O número total de células viáveis (NT) originárias do frasco era obtido pela seguinte equação matemática:

$$NT = \frac{\text{número total de células não coradas contadas x 10 (fator da diluição) x } 10^4}{\text{2 (número de quadrados do hemocitômetro utilizado na contagem)}}$$

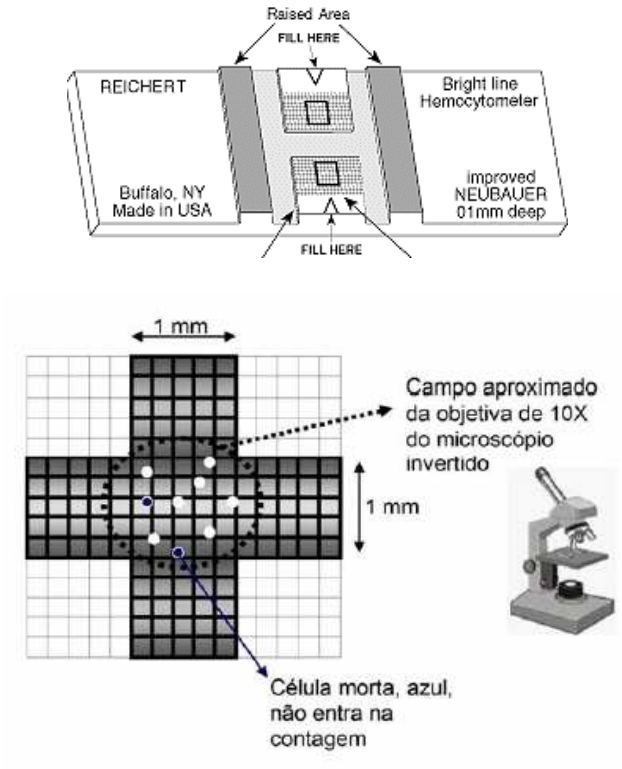

Figura 4.2- Câmara de NEUBAUER

De posse do número de células viáveis, calculou-se o número de células necessárias para o plaqueamento celular para realização dos ensaios de citotoxicidade. Inicialmente, calculou-se o número total de células do experimento (NTE), obtido quando da multiplicação do número total de poços a ser utilizado (NP) pelo número de células em cada poço (NC). Uma nova equação matemática foi feita, sob uma regra três, obtendo-se a quantidade de suspensão celular, para ser usada em cada experimento. Essa suspensão foi diluída (100 x NP) em meio de cultura para que em cada poço houvesse 100µl de meio com a quantidade de células diluídas. O plaqueamento celular em foi feito em placas de 96 poços (*Wells*) (*TTP,* Cultilab®, Campinas, Brasil).

Número total de células (NT)	_____	1000µl
NTE (NP x NC)	_____	X (suspensão celular)

4.3 Preparação do meio condicionado

Os materiais utilizados no experimento com as respectivas composições foram:

a- Pasta preconizada por Guedes-Pinto et al*.,* 1981 (PGP);

- 23,8% de Rifocort®
- 7,0% de paramonoclorofenol canforado (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil)
- 69,2% de iodofórmio (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil)

b- Pasta Vitapex® (Neo Dental Chemical Products Co., Tokyo, Japan) composta por:

- 40,4% de iodofórmio
- 30% de $Ca(OH)_2$
- 22,4% de óleo de silicone
- 6,9% de substâncias inertes

c- Pasta Óxido de Zinco e Eugenol (OZE) (WRIGHT et al., 1994):

- 2,5g de óxido de zinco (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil),
- 1mL de eugenol (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil)

d- Pasta Calen® (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil):

- Hidróxido de cálcio ..... 49,77 g%
- Excipientes: Óxido de zinco, Colofônia e polietilenoglicol 400 (PEG 400)

e- Pasta Calen PMCC® (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil):

- Hidróxido de cálcio..... 48,32 g%
- Paramonoclorofenol ..... 0,72 g%
- Cânfora ..... 2,16 g%
- Excipientes: Óxido de zinco, Colofônia e polietilenoglicol 400 (PEG 400)

A proporção da PGP foi baseanda na concentração de cada fármaco e nas proporções médias obtidas em um estudo-piloto, onde 38 cirurgiões dentistas com diferentes graus de experiência foram orientados a manipular a PGP na proporção indicada de três porções visualmente semelhantes (GUEDES-PINTO;

PAIVA; BOZZOLA, 1981). As proporções obtidas foram: 7% (Paramonoclorofenol canforado), 69,2% (Iodofórmio), 23,8% (Rifocort®) (MELLO-MOURA, 2007).

As demais substâncias testadas foram manipuladas de acordo com as instruções do fabricante e pesadas em balança de precisão.

A concentração utilizada para preparação do meio condicionado foi de 0,2 gramas do extrato bruto de cada fármaco em 1mL de meio de cultura (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1992), e suas respectivas diluições por dez (10x), cem (100x) e mil vezes (1000x). Os materiais foram então acondicionados na parte inferior de tubos de ensaio de 15 mL, seguido do acréscimo do meio de cultura DMEM/F12. Os tubos foram mantidos em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, em estufa a 37ºC, durante 1 hora (FRESHNEY, 1990), em seguida, os meios foram aspirados e colocados em novos tubos de ensaio e armazenados para experimento, totalizando 15 grupos experimentais.

4.4 Ensaio da Viabilidade e Sobrevivência celular

Os dados de citotoxicidade foram obtidos pela análise da viabilidade e sobrevivência celular, baseando-se na atividade mitocondrial das células (enzima mitocondrial desidrogenase succínica) pelo método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio). Este teste quantifica a conversão do MTT, um sal amarelo e insolúvel de estrutura molecular em anel, em cristais de formazan solúvel. O formazan, de cor purpúrea, é então solubilizado, e sua concentração determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro.

O teste utiliza os reagentes A, composto por 0,05g de MTT (Vybrant, Molecular Probes) em 10 mL de PBSA e reagente B (DMSO e solução tampão de glicina - 0,1M glicina, 0,1M NaCl, pH 10,5).

4.4.1 Viabilidade celular

Neste experimento, cada poço da placa de cultivo recebeu uma solução de 100µl de DMEM/F12 fresco contendo $2x10^3$ de células. As placas foram mantidas em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono a 37ºC, protegidas da luz, durante 24 horas, tempo necessário para aderência celular.

Em seguida, o meio de cultura dos poços foi aspirado cuidadosamente para não descolar a monocamada celular e substituído por 100µl de meio condicionado de acordo com os grupos acima citados. O grupo controle recebeu somente a suspensão de células em meio de cultura e teve seu meio trocado após 24 horas como os grupos testes. As placas foram novamente levadas à estufa a 37ºC, por mais 24 horas.

Decorrido esse período, o meio de cultura de cada poço foi aspirado, sendo então adicionados 100µl de meio DMEM fresco e 10µl do reagente A, e a placa foi incubada por mais 4 horas. Em seguida, 200µl de DMSO foram adicionados em cada poço, e 25µl de solução tampão de glicina e a solução foi gentilmente homogeneizada utilizando-se pipetador multicanal. A placa foi levada para leitura da absorbância de cada grupo em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences Biotrak II, Inglaterra) com filtro de 562nm.

4.4.2 Sobrevivência celular

O teste de longo prazo (24h, 48h e 72h) foi desenvolvido com $5x10^2$ células por poço presentes em 100µl de meio de cultura, e uma placa para ser analisada em cada dia.

Os procedimentos foram os mesmos do experimento de viabilidade celular até o primeiro dia de análise, ou seja, plaqueamento seguido de incubação por 24 horas, substituição do meio DMEM/F12 pelo meio condicionado e mais 24 horas de incubação em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono a 37ºC, protegidas da luz.

Após 24 horas de exposição aos meios condicionados, 50µl dos mesmos foram aspirados dos poços e 50µl de meio fresco foram adicionados às placas dos tempos 48 e 72h com o intuito de reduzir o contato celular com os fármacos, simulando a drenagem do sistema linfático *in vivo*. Em 48hs, o mesmo procedimento foi realizado com as placas do tempo 72 horas.

Nos dias das leituras de cada grupo, os meios condicionados foram aspirados e 100µl de meio de cultura fresco foram adicionados em cada poço, seguido da adição dos reagentes A e B, conforme referência anterior. A leitura da absorbância de cada grupo foi feita em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences Biotrak II, Inglaterra) com filtro de 562nm.

Cada substância e suas diluições foram testadas em triplicata tanto para os testes de viabilidade como para a sobrevivência celular.

4.5 Análise dos resultados

A análise dos dados foi feita em comparação com o grupo controle que representa 100% de viabilidade celular. A análise estatística deste trabalho foi realizada por meio de tabelas, estatísticas descritivas (média e erro-padrão da média) e testes estatísticos.

Para a verificação da normalidade dos dados, utilizaram-se os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. Havendo normalidade e homogeneidade dos dados, com o objetivo de comparar a média entre os grupos, foram realizados os testes estatísticos Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de *Tukey* com nível de significância de 5%.

4.6 Imunofluorescência

As células FP5 da passagem 4 a 9, subcultivadas em frascos de 20mL e obtidas pela perpetuação da linhagem celular, foram tripsinizadas. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspendido em 1mL de PBSA e, após nova contagem celular, 1 x 10^4 células/2mL DMEM/F12 foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro contendo lamínulas de vidro em cada uma. Decorridas 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e 2mL de meio de cultura condicionado de cada grupo teste na diluição de 100x foram adicionados a cada placa por mais 24 horas.

As placas foram sempre mantidas em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, a 37ºC.

As reações de imunofluorescência foram então realizadas. Os fibroblastos plaqueados nas lamínulas foram lavados duas vezes em solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBSA), pH 7,2; e em seguida, fixados em solução de paraformaldeído a 4% em PBSA em temperatura ambiente por 10 minutos. As células foram permeabelizadas com solução de Triton X-100 (Sigma) a 1% em PBSA por 10 minutos à temperatura ambiente. Para o bloqueio da marcação inespecífica, as células foram incubadas em solução de albumina bovina 1% (BSA) (Sigma) por 30 minutos em temperatura ambiente. Procedeu-se a incubação dos anticorpos primários (Quadro 4.1), na concentração de 1:50, durante 60 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Todos esses procedimentos descritos foram precedidos de quatro lavagens em PBSA e duas vezes em água de Milli-Q.

Utilizou-se, como anticorpos secundários, os anti-coelho para as células incubadas com fibronectina e para as células incubadas com tenascina, vimentina e colágeno tipo I, anticorpos anti-camundongos. Todos os anticorpos eram conjugados com fluoresceína na concentração de 1:50, durante 60 minutos e protegidos da luz.

As montagens das lamínulas sobre as lâminas de vidro foram realizadas com o meio de montagem Vectashield® com Dapi (Vectar Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA). As observações e fotomicrografias foram realizadas em epi-iluminação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiphot, usando objetivas Plan Neofluor de 10x e 40x e abertura numérica de 1,4.

Anticorpo	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
Tenascina	Monoclonal	Mouse	1:50	Santa Cruz, Biotechnoly
Fibronectina	Policlonal	Rabbit	1:50	Dako Cytomation
Colágeno Tipo I	Monoclonal	Mouse	1:50	Chemicon
Vimentina	Monoclonal	Mouse	1:50	Dako Cytomation

Quadro 4.1 - Anticorpos primários utilizados: tipo, origem, diluição e procedência

5 RESULTADOS

Para melhor compreensão, os resultados serão apresentados em seções: 1) Análise da citotoxicidade (viabilidade e crescimento celular) das pastas obturadoras de dentes decíduos; 2- Análise da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa humana por imunofluorescência.

5.1 Análise da citotoxicidade

A tabela 5.1 apresenta a análise descritiva e estatística dos resultados da viabilidade celular. Após realização dos testes de normalidade, observou-se que os dados apresentaram distribuição normal, portanto, para comparação das médias utilizou-se o teste de variância (ANOVA), com contraste de *Tukey* com nível de significância de 5%.

Na diluição (10x), a Pasta Guedes-Pinto, pasta OZE e pasta Calen® foram significativamente mais citotóxicas em relação ao controle ($p<0,05$). Não houve diferença entre os demais grupos, exceto à Pasta Guedes-Pinto que foi mais tóxica que a Vitapex® e a Calen PMCC® ($p<0,05$). Nas diluições 100x e 1000x, somente a pasta OZE foi mais citotóxica que o grupo controle ($p<0,05$), porém ela não apresentou diferença estatisticamente significativa que as demais pastas quanto à

toxicidade (p>0,05). Os resultados da viabilidade celular estão também apresentados no gráfico 5.2.

Tabela 5.1- Percentual da viabilidade celular de fibroblastos da polpa humana (FP5) após exposição a cinco fármacos (em 3 diluições) da terapia endodôntica de dentes decíduos

Diluição	**Percentual de Viabilidade (Erro Padrão da Média, ±SE) Material**					
	PGP	Vitapex®	OZE	Calen®	Calen PMCC®	Controle
10	69,7 [c]	87,6 [a, b]	74,6 [b, c]	83,0 [b, c]	88,8 [a, b]	100,0 [a]
	(± 3,2)	(± 3,6)	(± 2,4)	(± 2,4)	(± 2,5)	(± 1,9)
100	87,5 [a, b]	88,7 [a, b]	77,5 [b]	86,7 [a, b]	89,3 [a, b]	100,0 [a]
	(± 4,0)	(± 1,3)	(± 2,3)	(± 2,3)	(± 4,2)	(± 1,9)
1000	90,9 [a, b]	89,9 [a, b]	78,2 [b]	89,4 [a, b]	85,7 [a, b]	100,0 [a]
	(± 4,1)	(± 2,4)	(± 3,5)	(± 3,5)	(± 3,5)	(± 1,9)

Letras minúsculas iguais na mesma linha p>0,05
Letras minúsculas diferentes na mesma linha p<0,05
Teste de variância (ANOVA), com contraste de *Tukey,* nível de significância de 5%.

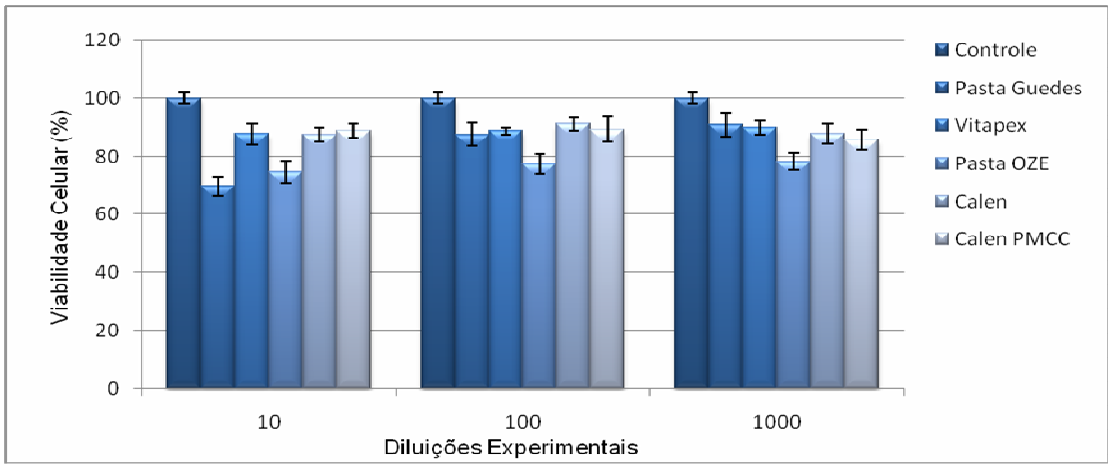

Gráfico 5.1- Percentual da viabilidade celular fibroblastos da polpa humana (FP5), após exposição a cinco fármacos (em 3 diluições) da terapia endodôntica de dentes decíduos

A tabela 5.2 apresenta a análise descritiva e estatística dos resultados da sobrevivência celular. Como no teste de viabilidade celular, os dados apresentaram distribuição normal, portanto, para comparação dos valores de densidades óticas, utilizou-se, novamente, o teste de variância (ANOVA), com contraste de *Tukey* com nível de significância de 5%.

Na diluição 10x, observou-se que em 24h e 48h, todos os fármacos apresentaram curva de crescimento similar ao grupo controle ($p>0,05$). Ao final do experimento (72hs), somente a Pasta Guedes-Pinto não manteve a mesma capacidade de proliferação celular que o grupo controle ($p<0,05$), sendo também inferior às pastas Vitapex®, Calen® e Calen PMCC® ($p<0,05$).

Na segunda concentração (100x), todos os fármacos apresentaram curva de crescimento similar ao grupo controle em todos os tempos experimentais ($p>0,05$). Na maior diluição (1000x), no período de 24 e 48hs não houve diferença entre o crescimento celular dos fármacos em relação ao grupo controle. Novamente, no último tempo experimental, a pasta Guedes-Pinto apresentou menor proliferação celular em relação ao grupo controle e à pasta Calen PMCC® ($p<0,05$).

Considerando-se a capacidade proliferativa celular de cada grupo, observou-se que entre o primeiro e último tempos experimentais, houve diferença estatisticamente significativa no grupo controle ($p<0,05$), ou seja, as células sem tratamento apresentaram uma curva normal de crescimento. Alguns fármacos também permitiram tal comportamento: Calen PMCC® em todas as diluições, pasta OZE na diluição 10x e Calen® na diluição 1000x.

Tabela 5.2- Sobrevivência celular de fibroblastos da polpa humana (FP5) após exposição a fármacos (em 3 diluições) da terapia endodôntica de dentes decíduos, em três tempos experimentais

Diluição	Tempo (horas)	Unidades de Absorbância MTT – Densidade Ótica (Erro Padrão, ±SE) Material					
		PGP	Vitapex®	OZE	Calen®	Calen PMCC®	Controle
10	24	0,143 [a] (± 0,010)	0,128 [a] (± 0,015)	0,125 [a] (± 0,026)	0,117 [a] (± 0,027)	0,128 [a *] (± 0,012)	0,142 [a *] (± 0,010)
	48	0,158 [a] (± 0,043)	0,190 [a] (± 0,027)	0,195 [b] (± 0,045)	0,191 [a] (± 0,028)	0,192 [a] (± 0,029)	0,191 [a] (± 0,017)
	72	0,077 [c] (± 0,005)	0,230 [a, b] (± 0,022)	0,207 [a, b, c] (±0,027)	0,216 [a, b] (± 0,014)	0,276 [a, b *] (± 0,026)	0,315 [a *] (± 0,027)
100	24	0,105 [a] (± 0,016)	0,121 [a] (± 0,018)	0,118 [a *] (± 0,020)	0,111 [a] (± 0,020)	0,119 [a *] (± 0,020)	0,142 [a *] (± 0,010)
	48	0,204 [a] (± 0,045)	0,193 [a] (± 0,028)	0,191 [a] (± 0,040)	0,186 [a] (± 0,031)	0,190 [a] (± 0,025)	0,191 [a] (± 0,017)
	72	0,224 [a] (± 0,031)	0,251 [a] (± 0,020)	0,268 [a *] (±0,032)	0,238 [a] (± 0,015)	0,304 [a*] (± 0,028)	0,315 [a *] (± 0,027)
1000	24	0,106 [a] (± 0,010)	0,101 [a] (± 0,019)	0,107 [a] (± 0,020)	0,114 [a *] (± 0,021)	0,098 [a *] (± 0,017)	0,142 [a *] (± 0,010)
	48	0,141 [a] (± 0,020)	0,177 [a] (± 0,020)	0,216 [a] (± 0,038)	0,224 [a] (± 0,043)	0,174 [a] (± 0,0335)	0,191 [a] (± 0,017)
	72	0,150 [c] (± 0,009)	0,206 [a, b, c] (± 0,009)	0,215 [a, b, c] (±0,036)	0,275 [a, b, c *] (± 0,026)	0,299 [a, b *] (± 0,046)	0,315 [a *] (± 0,027)

Letras minúsculas iguais na mesma linha p>0,05
Letras minúsculas diferentes na mesma linha p<0,05
Teste de variância (ANOVA), com contraste de *Tukey,* ao nível de significância de 5%.
* p<0,05, diferença de crescimento do grupo entre 24 e 72h

O comportamento dos fármacos, em suas respectivas diluições, nos três tempos experimentais, está apresentado nos gráficos 5.2, 5.3 e 5.4.

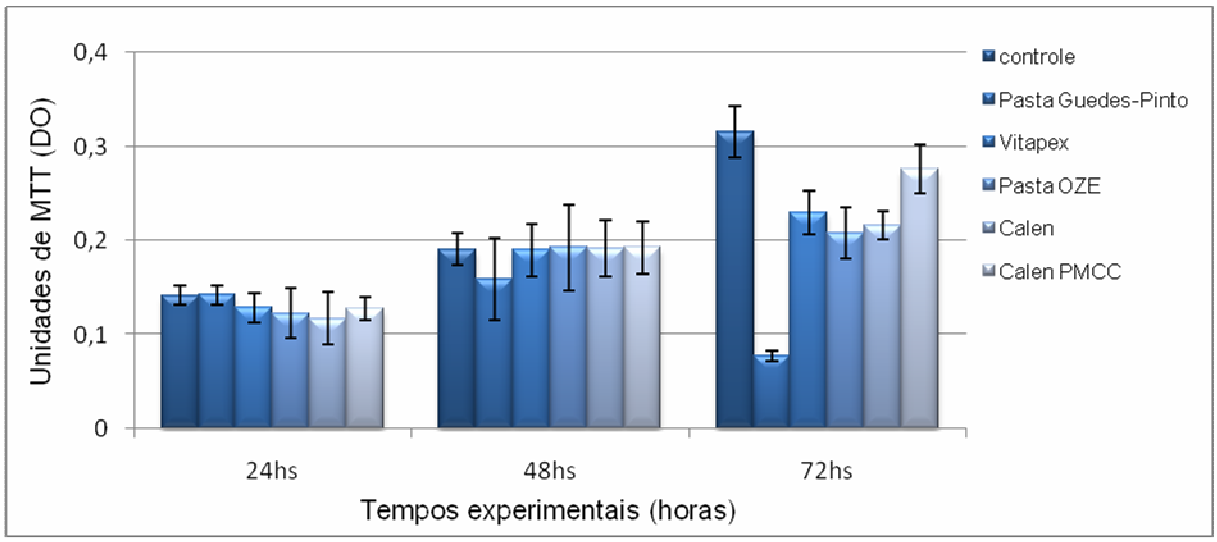

Gráfico 5.2- Sobrevivência celular de fibroblastos da polpa humana (FP5) após exposição a fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos na diluição 10x, em três tempos experimentais

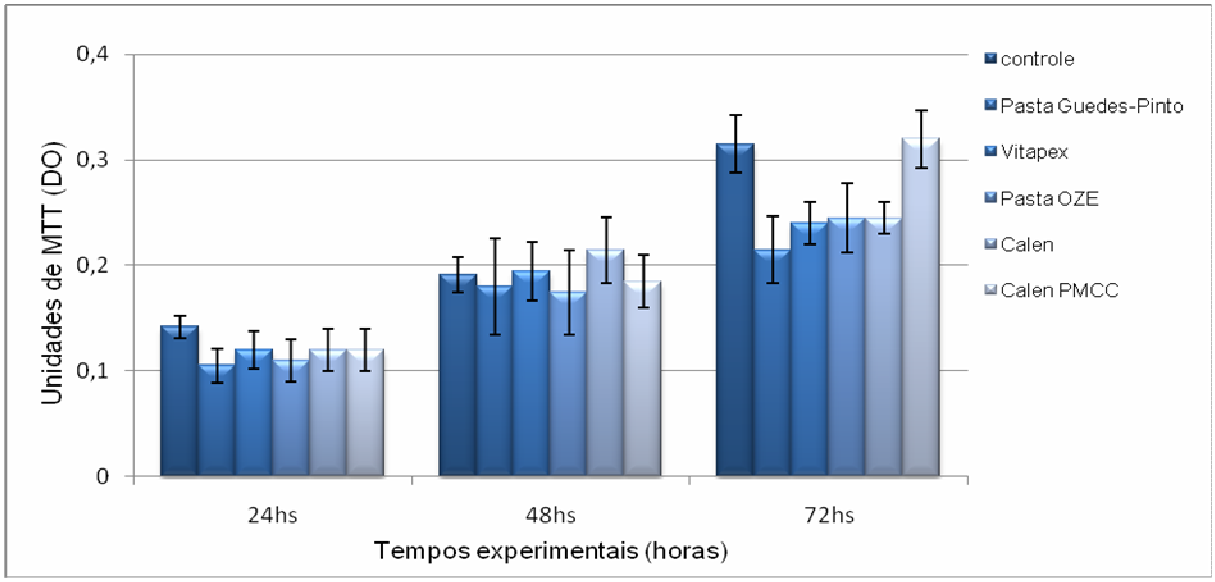

Gráfico 5.3- Sobrevivência celular de fibroblastos da polpa humana (FP5) após exposição a fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos na diluição 100x, em três tempos experimentais

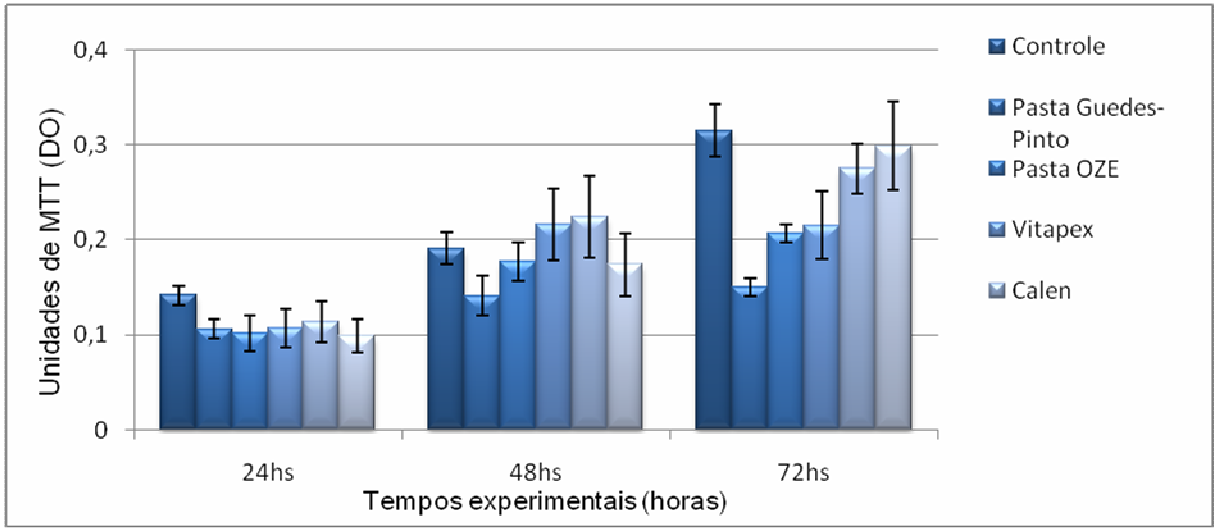

Gráfico 5.4- Sobrevivência celular de fibroblastos da polpa humana (FP5) após exposição a fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos na diluição 1000x, em três tempos experimentais

5.2 Imunofluorescências

As proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto da linhagem celular FP5 encontraram-se distribuídas tanto no grupo controle como nos grupos formados pelos fármacos: Pasta Guedes-Pinto, Vitapex®, OZE, Calen® e Calen PMCC®.

A vimentina, proteína do citoesqueleto, foi distribuída na forma de filamentos ao longo do citoplasma (Figura 5.1).

A fibronectina demonstrou uma marcação positiva forte, formando uma rede reticular no citoplasma (Figuras 5.2). A tenascina apareceu como pequenos pontos (vesículas) distribuídos, homogeneamente, no citoplasma, locais de adesão da célula ao substrato (lamínula de vidro) e na região Peri-nuclear (Figura 5.3). O colágeno I também apresentou distribuição homogênea no citoplasma, de maneira pontual como vesículas secretoras (Figura 5.4).

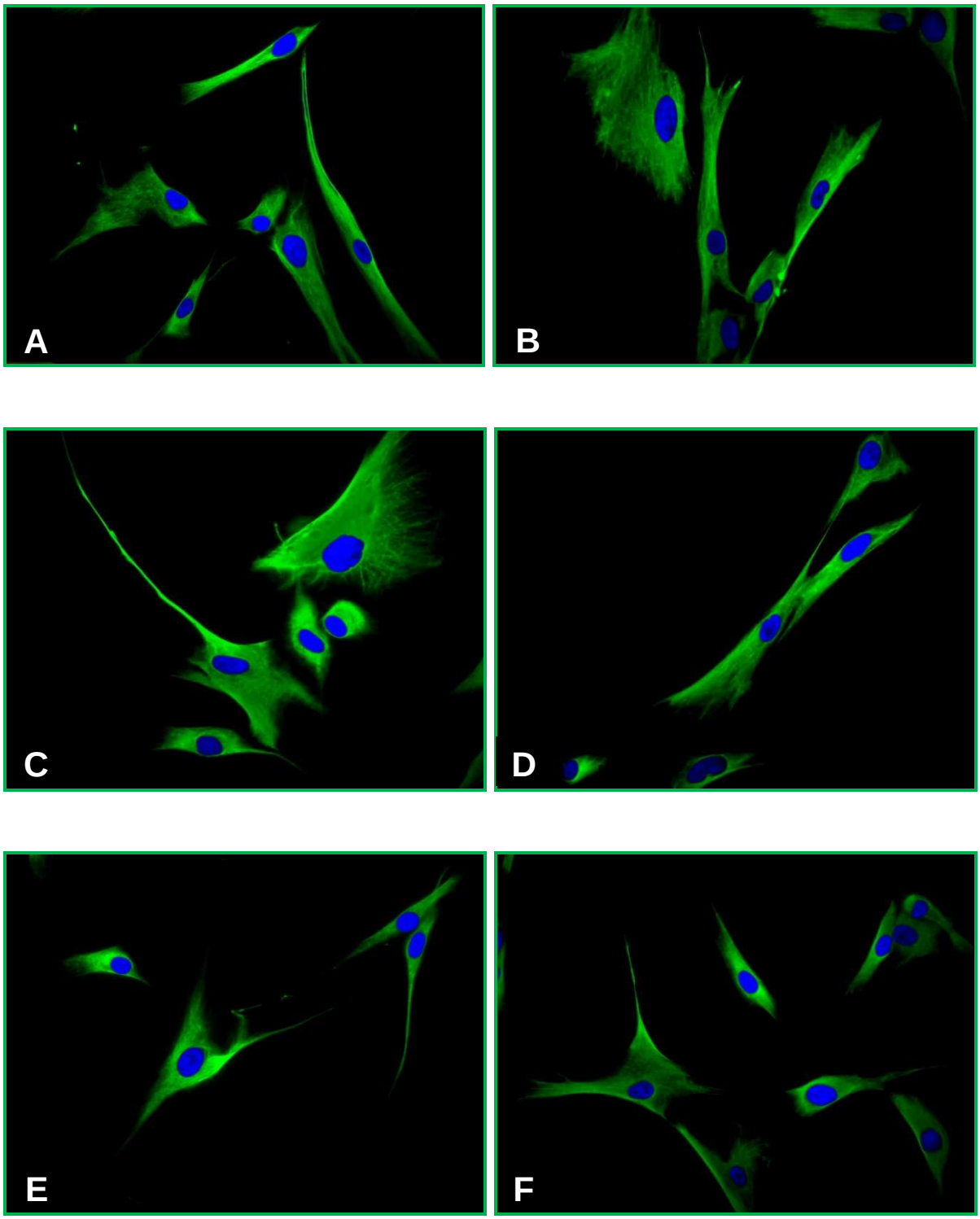

Figura 5.1- Fotomicrografias de fluorescência para a Vimentina em fibroblastos de polpa humana (FP5): grupo controle (A), após exposição aos fármacos pasta Guedes-Pinto (B), Vitapex® (C), pasta OZE (D), Calen® (E) e Calen PMCC® (F). Aumento de 40x

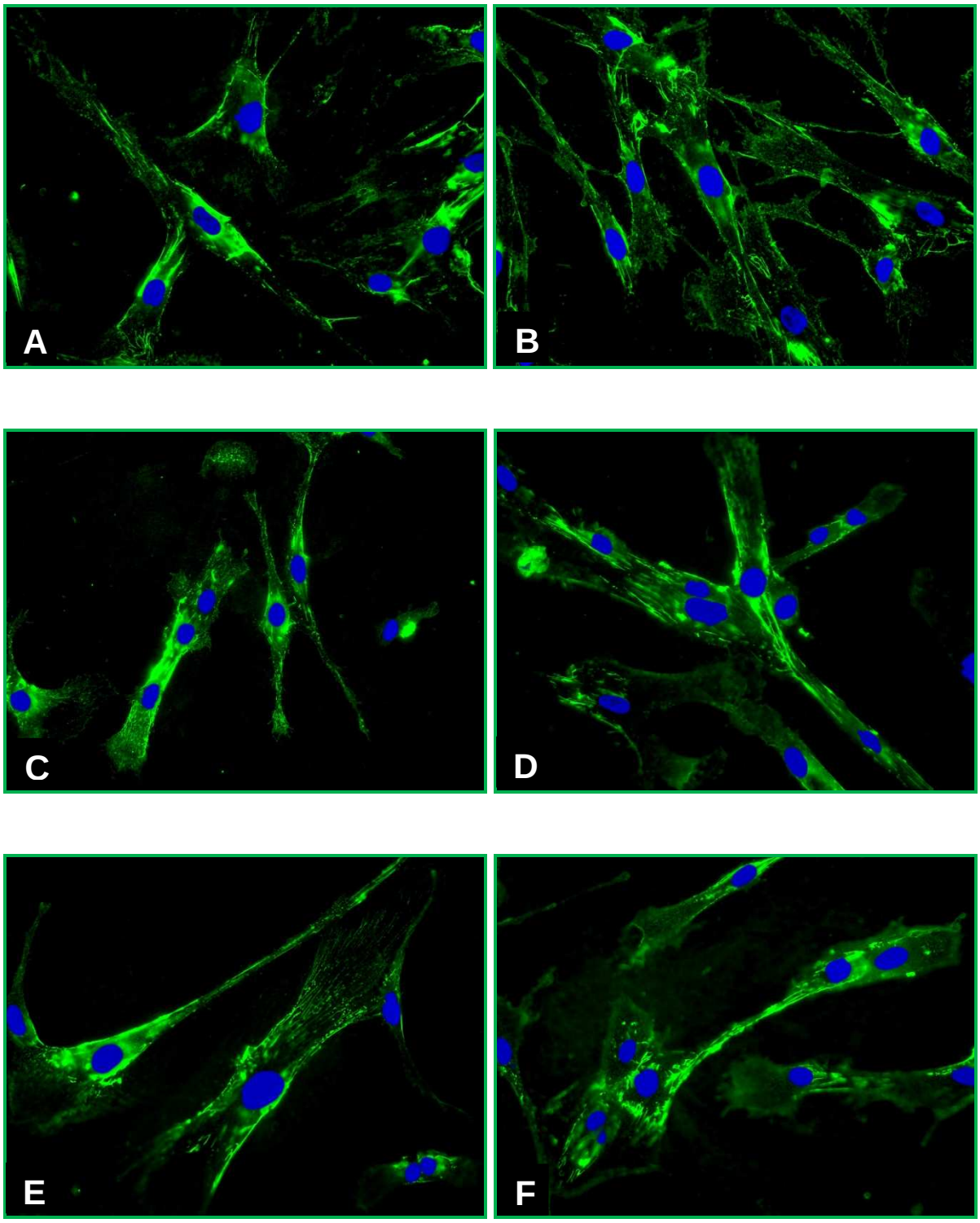

Figura 5.2- Fotomicrografias de fluorescência para a Fibronectina em fibroblastos de polpa humana (FP5): grupo controle (A), após exposição aos fármacos pasta Guedes-Pinto (B), Vitapex® (C), pasta OZE (D), Calen® (E) e Calen PMCC® (F). Aumento 40x

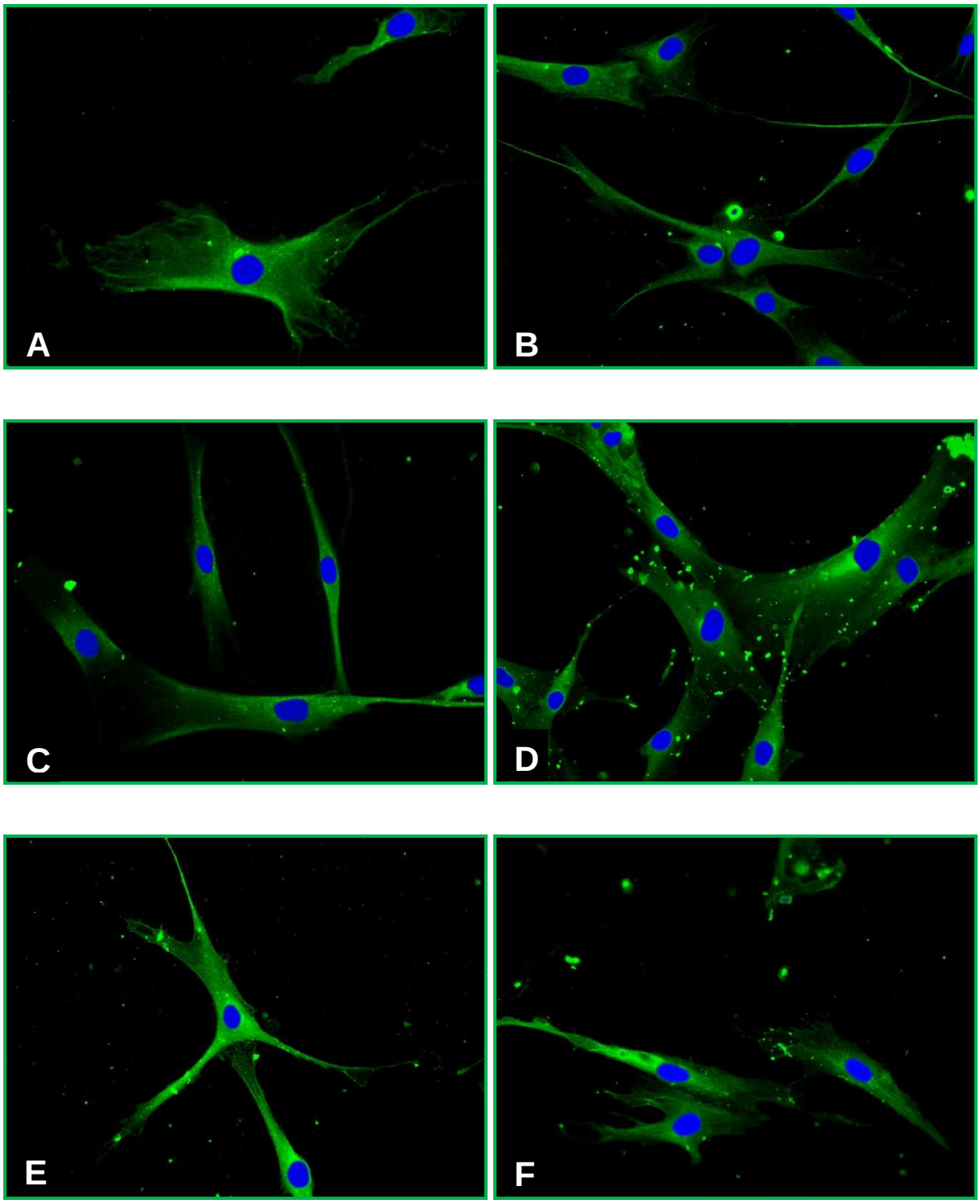

Figura 5.3- Fotomicrografias de fluorescência para o Colágeno I em fibroblastos de polpa humana (FP5): grupo controle (A), após exposição aos fármacos pasta Guedes-Pinto (B), Vitapex® (C), pasta OZE (D), Calen® (E) e Calen PMCC® (F). Aumento 40x

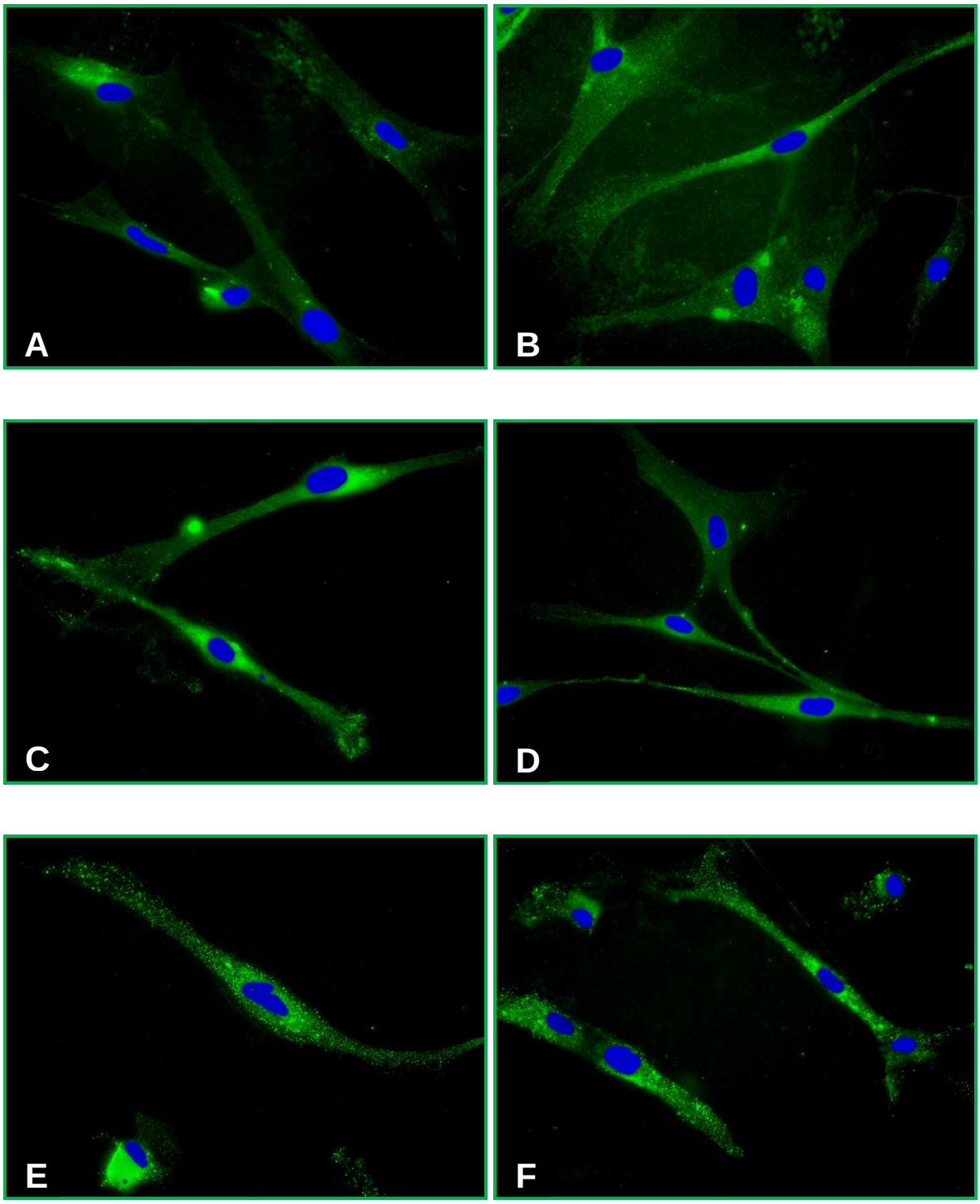

Figura 5.4- Fotomicrografias de fluorescência para a Tenascina em fibroblastos de polpa humana (FP5): grupo controle (A), após exposição aos fármacos pasta Guedes-Pinto (B), Vitapex® (C), pasta OZE (D), Calen® (E) e Calen PMCC® (F). Aumento 40x

6 DISCUSSÃO

As pesquisas *in vitro* buscam simular em laboratório as condições biológicas mais próximas das reais para fornecer aos pesquisadores subsídios para estudos subsequentes. Entretanto, a principal limitação da investigação experimental de laboratório refere-se à transposição dos resultados para os seres humanos, uma vez que resultados de estudos *in vitro* podem não ser observados em estudos *in vivo*. Nestes casos, são necessários estudos clínicos complementares em humanos para que os resultados possam servir como base para a prática clínica (ESTRELA, 2001).

Com o intuito de padronizar os testes *in vitro*, várias organizações estabeleceram guias ou protocolos para teste de materiais como a *Fédération Dentáire International* (1980), *American Society for Testing and Materials* (1992) e *International Organization for Standardization* (1997). A *Fédération Dentáire International*, em 1980, publicou um conjunto de métodos-padrões utilizado para a avaliação biológica dos materiais dentários. Dependendo da classificação do material, (restaurador, medicamento intracanal, medicamento periodontal, vernizes, etc.) alguns testes são recomendados para determinação de sua resposta biológica. Os testes foram classificados em iniciais, secundários e de aplicação.

Os testes iniciais determinam o comportamento dos materiais ou seus componentes, reduzindo assim a necessidade de pesquisas com animais em laboratório. Dentre eles, os mais utilizados são os de citotoxicidade em culturas de células (ESTRELA, 2001; FÉDÉRATION DENTÁIRE INTERNATIONAL, 1980).

A definição de citotoxicidade varia, dependendo da natureza do estudo e, se as células são de fato mortas ou somente possuem seu metabolismo alterado (FRESHNEY, 1990). Segundo Hanks, Wataha e Sun (1996), os ensaios de citotoxicidade medem somente efeitos finitos nas células durante as primeiras 12-24hs após exposição a substâncias tóxicas, sendo que elas podem sucumbir ou recuperar-se dessa injúria. Além disso, muitas reações biológicas *in vivo* não são simplesmente citotóxicas, mas se prolongam por mais de 24 horas. Apesar destas limitações, os ensaios de citotoxicidade são amplamente empregados por não possuírem custo elevado, serem facilmente quantificados e reprodutíveis (FRESHNEY, 1990).

No presente estudo, alguns fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos como a pasta Guedes-Pinto, Vitapex®, pasta OZE, Calen® e Calen PMCC®, foram submetidos a dois testes de citotoxicidade: viabilidade e sobrevivência celular. Os ensaios de viabilidade mediram a proporção de células viáveis após exposição a procedimentos potencialmente traumáticos. Porém, como dito anteriormente, quando as células são expostas a materiais tóxicos ou até mesmo bioestimulantes, tais efeitos podem aparecer muitas horas ou dias depois. Portanto, os testes de longo-prazo foram usados para demonstrar a sobrevivência celular (FRESHNEY, 1990), ou seja, a capacidade proliferativa das mesmas.

A quantificação celular foi realizada pelo método colorimétrico do MTT, desenvolvido por Mosmann (1983), que se baseia na atividade mitocondrial das células (enzima mitocondrial desidrogenase succínica) que converte o MTT em cristais azuis de formazan solúvel, quantificado por espectrofotometria. Sendo assim, a atividade mitocondrial, presente somente nas células vivas, permitiu mensurar a viabilidade e sobrevivência celular.

Os resultados de viabilidade celular do presente estudo demonstraram que alguns fármacos (Pasta Guedes-Pinto, pasta OZE e Calen®) na maior concentração (10x) foram significativamente mais citotóxicos que o grupo controle, sendo que para a pasta OZE, este efeito perdurou nas demais diluições (Tabela 5.1).

A citotoxicidade da pasta Guedes-Pinto foi maior somente na sua menor diluição (10x), fato que pode ser explicado pela maior concentração do paramonoclorofenol canforado presente no meio condicionado, o componente mais citotóxico da pasta (SANTOS, 1998). Uma vez que a citotoxicidade do paramonoclorofenol canforado é dose-dependente em fibroblastos do ligamento periodontal humano, como demonstrado Chang et al. (1999); acredita-se que tal efeito tóxico não tenha sido exercido nos fibroblastos de polpa humana nas maiores diluições da PGP.

A pasta de óxido de zinco e eugenol foi igualmente biocompatível aos demais fármacos nessa pesquisa, diferenciando-se somente do grupo controle (Tabela 5.1). Entretanto, Huang, Ding e Kao (2007) constataram que a pasta de OZE acrescida de formocresol foi mais citotóxica que a pasta Vitapex® e a pasta de HC com paramonoclorofenol canforado, similar à pasta Calen PMCC®, em uma linhagem de osteossarcoma humano. Esta diferença de biocompatibilidade se deve, provavelmente, à presença do formocresol, já que o formaldeído é altamente citotóxico a fibroblastos de polpa humana (JENG; FEIGAL; MESSER, 1987) e causador de alterações cromossômicas em células embrionárias de camundongos (HIKIBA et al., 2005).

Wright et al. (1994) também demonstraram que a pasta de OZE fresca e a pasta Kri1 ou Walkolf, após 4h de contanto indireto com a linhagem de fibroblastos

L929, apresentaram citotoxicidade semelhante e ambas foram tóxicas em relação ao grupo controle. A tendência de maior citotoxicidade da Kri1 em relação à pasta OZE se manteve ao avaliar os materiais após 1 e 7 da reação de presa, mas aos 14 e 28 dias, ambos os materiais foram biocompatíveis. Os autores justificaram seus resultados pelo tipo de material: após a reação de presa, o eugenol se liga ao óxido de zinco, não sendo liberado para o meio e, portanto, exercendo baixo poder citotóxico. Por sua vez pasta Kri1 libera seus componentes (cânfora, paramonoclorofenol, e mentol) para o meio, que são citotóxicos nos primeiros momentos experimentais, porém tendem a se estabilizar.

Os fármacos à base de hidróxido de cálcio como a Calen® e Calen PMCC® não foram menos citotóxicos que os demais no presente estudo (Tabela 5.1). Estes resultados também foram encontrados na viabilidade celular por Ferreira et al. (2007) e Cerqueira et al. (2007), quando compararam PGP com a pasta de HC na linhagem de fibroblastos L929 e NIH-3T3, respectivamente, onde ambas as pastas apresentaram citotoxicidade semelhante. Entretanto, Huang, Ding e Kao (2007) demonstraram que a Vitapex® e uma pasta de HC acrescida de iodofórmio mostraram-se mais biocompatíveis do que pastas de HC e OZE acrescidas de formocresol.

Na presente pesquisa, os dados da sobrevivência celular apontaram que todos os fármacos comportaram-se semelhantemente ao grupo controle nos primeiros tempos experimentais (24 e 48h). Somente no último tempo, 72h, a pasta Guedes-Pinto apresentou uma menor tendência de proliferação celular nas concentrações 10x e 1000x (Tabela 5.2).

Estes resultados não foram observados por Ferreira et al. (2007), pois a pasta Guedes-Pinto já inviabilizou o crescimento celular em 1, 3, 5 e 7 dias. A pasta

de HC também obteve uma curva de crescimento inferior ao grupo controle. Neste, as células foram expostas aos fármacos de forma direta (extratos brutos sobre lamínulas de vidro), mas o mesmo não foi diluído, uma provável explicação para a maior citotoxicidade encontrada. Principalmente para a Pasta Guedes-Pinto, devido à alta concentração de paramonoclorofenol canforado com já explicando anteriormente. Ressalta-se ainda que, Ferreira et al. (2007) utilizaram o método de exclusão pelo azul de *Trypan,* que analisa a citotoxicidade pela alteração na permeabilidade/integridade da membrana celular, enquanto que os ensaios metabólicos, como o MTT usado na presente pesquisa, são mais sensíveis e conseguem analisar mudanças sub-letais nas células (MURRAY; GARCÍA-GODOY; GARCÍA- GODOY, 2007).

Resultados distintos foram observados por Santos et al. (2005), ao avaliaram a citotoxicidade e capacidade reparacional *in vitro* de 8 fármacos usados na terapia endodôntica de dentes decíduos: pastas à base de HC (Calen®, Calen® PMCC e HC com soro fisiológico), pastas iodoformadas (pasta Guedes-Pinto, pasta Guedes-Pinto pré-fabricada, Walkolf e Maisto) e pasta de óxido zinco e eugenol. Os fármacos foram depositados sobre lamínulas de vidro colocadas em contato direto com fibroblastos embrionários de camundongo (NIH-3T3). A pasta Calen® apresentou o menor efeito citotóxico, enquanto a Walkolf demonstrou maior toxicidade após sete dias de experimento. Apesar da pasta Calen® ter sido a menos citotóxica, ela apresentou baixo poder de quimiotaxia para macrófagos, propriedade presente na Pasta Guedes-Pinto.

Diante do exposto, nota-se que a adição de componentes antimicrobianos às pastas aumenta seu poder citotóxico: paramonoclorofenol canforado adicionado à pasta Guedes-Pinto e à pasta Kri1 (FERREIRA et al., 2007; SANTOS, 1998),

formocresol acrescido à pasta de OZE ou hidróxido de cálcio (HUANG; DING; KAO, 2007).

Ressalta-se ainda que neste trabalho, o contato dos fármacos com as FP5 ocorreu de forma indireta pelo preparo de meios condicionados, ou seja, as células não tiveram contato direto com os fármacos propriamente ditos. Esta forma de exposição pode influenciar na citotoxicidade final uma vez que materiais que tomam presa, como a pasta de OZE, não mais libera eugenol, enquanto fármacos como pasta Guedes-Pinto cessam a liberação de seus componentes citotóxicos para o meio de cultura, o que pode causar uma diminuição, mas não a eliminação da sua toxicidade.

Em adição, os diferentes tipos celulares, as variadas concentrações das substâncias testadas e forma de contato, distintos tempos experimentais e tipos de ensaios utilizados nos testes de citotoxicidade tornam difícil a comparação de resultados do presente estudo com a literatura consultada. Não obstante, poucos são os trabalhos que avaliam a citotoxicidade dos fármacos empregados na terapia endodôntica de dentes decíduos.

Com relação ao efeito dos fármacos estudados na distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana, observou-se que todas as pastas influenciaram positivamente na marcação das proteínas estudadas.

A vimentina esteve presente em todos os grupos, demonstrando que as células estudadas são de origem mesenquimal (Figura 5.1). Assim como na presente pesquisa, outros estudos também encontraram a vimentina distribuída no citoplasma de fibroblastos de polpa e papila dentária (LESOT et al. 1982; LOMBARDI et al., 1992; MARTINEZ; ARAÚJO, 2004; MOXHAM et al., 1998). Sua

marcação foi também positiva em fibroblastos do ligamento periodontal (MOXHAM et al., 1998) e odontoblastos (LOMBARDI et al., 1992). Durante a morfogênese e diferenciação celular, a vimentina acompanha a polarização dos odontoblastos (LESOT et al. 1982), sendo sua distribuição mantida nas fases adultas, porém, com significativa redução (MOXHAM et al., 1998).

Além da função estrutural do citoesqueleto de células mesenquimais, a intensa presença da vimentina nos tecidos pulpares e do ligamento periodontal aponta para sua função de suporte destes tecidos quando submetidos aos esforços mecânicos (MOXHAM et al., 1998).

A fibronectina esteve fortemente marcada no citoplasma das células FP5, formando uma rede reticular, tanto no grupo controle como nos demais grupos compostos pelos fármacos estudados (Figura 5.2). O colágeno I e a tenascina também estiveram distribuídos, pontualmente, no citoplasma das FP5: a tenascina marcada nos locais de adesão célula substrato (Figura 5.4) e o colágeno I como vesículas secretoras (Figura 5.3). Em outras células pulpares, também se observou a distribuição de tenascina e fibronectina (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004) e colágeno tipo I (GARCIA et al., 2003; MARTINEZ; ARAÚJO, 2004).

A presença e função da fibronectina juntamente com a tenascina já estão bem estabelecidas durante odontogênese (LESOT; OSMAN; RUCH, 1981; THESLEFF; MACKIE; VAINIO, 1987; THESLEFF; VAINIO; JALKALEN, 1989). A manutenção da expressão da fibronectina e tenascina em células pulpares adultas parece estar envolvida na regulação da mediação da diferenciação celular envolvidas na formação das matrizes de tecidos duros (LUKINMAA; MACKIE; THESLEFF, 1991; THESLEFF; MACKIE; VAINIO, 1987). No entanto, Martinez et al.

(2000) não observaram a expressão da fibronectina e tenascina em fibroblastos pulpares com processo inflamatório.

Quando ocorre uma injúria pulpar, os odontoblastos são estimulados a produzir dentina reparadora. Caso a injúria seja tal que cause a destruição dos odontoblastos, novos odontoblastos diferenciados das células mesenquimais assumem essa função reparadora.

Assim como na polpa, em condições patológicas nas regiões perirradiculares, cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos também são geralmente destruídos e substituídos por células indiferenciadas capazes de se diferenciarem e produzirem tecidos reparativos pela ação de moléculas sinalizadoras desse microambiente. Os mecanismos reguladores utilizam múltiplas citocinas que interagem com numerosos outros fatores como: interação célula-célula, moléculas da matriz extracelular e níveis de diferenciação (SILVA; ROSA; LARA, 2004). Como exemplo, a tenascina possui importante papel na formação de tecido ósseo, estando presente em células osteoblastóides desde o início da ossificação (intramembranosa ou endocondral) até o tecido ósseo adulto. Por estar ausente na matriz mineralizada, acredita-se que a tenascina seja importante na regulação da função osteoblástica e osteoclástica, ou seja, em sítios de rápida remodelação óssea (MACKIE; THESLLEF; CHIQUET-EHRISMANN, 1987).

Essa ação reparadora, tanto na polpa dentária quanto na região óssea subjacente aos tecidos pulpares, pode ser estimulada ou acelerada por fatores ambientais como a presença de fármacos da terapia pulpar.

Alguns estudos apontam que o hidróxido de cálcio usado em capeamento pulpar foi capaz de induzir a produção de proteínas da matriz extracelular. Quando aplicado sobre a polpa exposta, ele resulta no desenvolvimento de um processo

necrótico superficial da polpa, desenvolvido pelos íons de hidroxila liberados pelo material, causando discreta irritação, que serve como estímulo para a defesa e o reparo pulpar. Este processo oferece suporte à formação da barreira calcificada composta por três camadas: superficial (amorfa, composta por detritos), média (fibrodentina atubular) e profunda (ortodentina tubular) (SCHR□DER, 1985). Seux et al. (1991) demonstraram que células pulpares humanas foram capazes não somente de crescerem e se proliferarem em cultura na presença de microcristais cálcicos, como também de sintetizarem e depositarem ao redor dos cristais, colágeno tipo I e fibronectina durante quatro semanas de cultivo. A deposição de matriz extracelular ocorreu organizadamente ao redor dos cristais, formando duas camadas distintas; sendo a camada em contato direto com os cristais constituída de fibronectina, enquanto esta foi rodeada por fibrilas de colágeno. Os achados deste experimento sugerem que tais alterações intracelulares na diferenciação em odontoblastos *in vivo* quando na presença do hidróxido de cálcio resultam na formação de ponte calcificada.

Yoshiba et al. (1996) testaram em seu estudo, a hipótese de que a fibronectina está envolvida nos processos iniciais da troca e diferenciação dos odontoblastos e na formação de dentina reparadora durante a formação da “ponte dentinária” em dentes humanos, após capeamento pulpar com hidróxido de cálcio, pela técnica de localização imunohistoquímica. Os resultados obtidos mostraram marcação positiva para fibronectina na camada de calcificação e células pulpares associadas a essa camada já ao sétimo dia do pós-operatório. No 14º dia, células semelhantes a odontoblastos encontravam-se alinhadas a uma matriz irregular positiva para fibronectina. Sugeriu-se então que a fibronectina está associada com a camada inicialmente calcificada, podendo mediar diferenciação de células pulpares

em odontoblastos durante a dentinogênese reparadora após o capeamento pulpar com hidróxido de cálcio.

Este processo pode ser explicado pelo efeito da liberação dos íons de cálcio como avaliado em células da polpa dental humana (MIZUNO; BANZAI, 2008). Quando essas células foram cultivadas em meios com altas concentrações de cálcio, a expressão da fibronectina foi dose-dependente pela análise quantitativa de PCR (*polymerase chain reaction*). Em adição, houve aumento da expressão de fenótipos de células formadoras de tecidos mineralizados (osteocalcina e osteopontina) quando as células foram cultivadas em contato a fibronectina. Sendo assim, íons de cálcio do hidróxido de cálcio podem induzir a produção da fibronectina, e esta por sua vez pode induzir a diferenciação de células pulpares em células formadoras de tecidos mineralizados, responsáveis pela formação da “ponte dentinária”.

Em 2002, Kitasako et al. verificaram a localização, arranjo, e possível função das fibras inter-odontoblásticas de colágeno em dentes de macaco que tiveram suas polpas dentárias expostas e capeadas com hidróxido de cálcio, através de microscopia de luz e de transmissão de elétrons e técnica imunohistoquímica. Ao 7º dia do pós-operatório, fibras colágenas inter-odontoblásticas foram observadas estendendo-se da dentina normal (original), passando por entre os odontoblastos, sendo constituídas de uma porção delgada e outra mais espessa. No 14º dia, estas fibras colágenas penetravam na pré-dentina, tornando-se incorporadas à dentina mineralizada. Com trinta dias, as fibras inter-odontoblásticas alcançavam o processo celular, entretanto, elas não eram mais observadas na área de células odontoblastóides da nova dentina tubular formada, e sim embebidas dentro da ponte

dentinária formada. A composição das fibras colágenas inter-odontoblásticas foi positiva para colágeno tipo I e fibronectina.

Utilizando a técnica de imunohistoquímica, Fernandes et al. (2008) também observaram a produção de colágeno III e fibronectina após realização de capeamento pulpar em cães com uso de HC e sistema adesivo. Somente nos dentes expostos ao HC houve marcação para as proteínas acima citadas, que inicialmente estavam presentes na matriz extracelular de forma difusa e homogênea, e, posteriormente encontravam-se na camada de células tipo-odontoblasto abaixo da ponte dentinária.

Na literatura consultada, não foi encontrado nenhum trabalho sobre a distribuição de proteínas da matriz extracelular quando expostas a materiais contendo iodofórmio. Em um estudo clínico controlado e randomizado, observou-se a eficácia da PGP quando colocada em alvéolos depois de extrações de molares em 40 pacientes HIV positivos, com taxas de CD4 abaixo de 200 cels/mm3. Os resultados mostraram que os alvéolos do grupo tratado com a PGP obtiveram um processo de reparação mais rápido que nos pacientes do grupo de controle (ORTEGA et al., 2007). Respostas favoráveis no pós-operatório (menor sintomatologia dolorosa e edema) também foram observadas em pacientes que receberam curativos com gazes impregnadas com parafina de bismuto-iodofórmio, após exodontia de terceiros molares (HOLLAND; HINDLE, 1984; LYALL, 1991).

Em pulpotomias em dentes decíduos, a pasta Guedes-Pinto apresentou superioridade em relação ao formocresol (ARAUJO et al., 1995) e resultados satisfatórios (BENGTSON; BENGTSON, 1994), o que também observado em dentes permanentes (CASTRO, 1998). Em pulpectomias, houve sucesso da terapia com

remissão dos processos patológicos e neoformação óssea (PUPPIN-RONTANI; PETERS; WORLICZECK, 1994).

Transpondo estes resultados clínicos para uma análise histopatológica, acredita-se que o iodofórmio possa contribuir para a agregação e quimiotaxia de células inflamatórias, influenciando na manutenção ou resolução de um processo reparador. Santos (2002) avaliou o potencial quimiotáxico da PGP e do HC para a migração de macrófagos. A obtenção dos macrófagos para a cultura celular foi proveniente de enxerto subcutâneo em ratos. Os testes de invasão com o compartimento de *Transwell* demonstraram uma maior capacidade de aderência para os macrófagos com a PGP em comparação com a pasta de HC e com o grupo controle. Em adição, a PGP apresentou um potencial maior para quimiotaxia de macrófagos.

Os achados do presente estudo não demonstraram diferença na imunodistribuição de proteínas da matriz extracelular e citoesqueleto de fibroblastos da polpa humana quando expostos a fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos.

A ausência de diferença pode ser resultado da metodologia empregada, a imunofluorescência, uma técnica que avalia, qualitativamente, a distribuição das proteínas. Outras metodologias, de caráter mais quantitativo como *Western-Blotting*, *Real Time Polymerase-Chain-Reaction* (RT PCR), poderiam ser, talvez, mais sensíveis aos efeitos dos fármacos. No entanto, a quantificação dessas proteínas está além do escopo deste trabalho.

Portanto, são necessários novos estudos para que possamos avaliar a expressão das proteínas, bem como de outras proteínas como as mineralizantes (osteonectina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína, proteína óssea

morfogenética, dentre outras) uma vez que a produção das mesmas é fundamental na terapia endodôntica de dentes decíduos que visa a remissão dos processos patológicos e manutenção da integridade e a saúde dos tecidos dentais e seus adjacentes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que:

1) Na análise da citotoxicidade de fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos em fibroblastos de polpa dental humana, o ensaio de viabilidade celular demonstrou que as pastas Guedes-Pinto, de Óxido de Zinco e Eugenol, e Calen® foram citotóxicas que o grupo controle somente na maior concentração, sendo que esse efeito perdurou para a pasta de Óxido de Zinco e Eugenol nas menores concentrações. As diferenças de citotoxicidade entre os fármacos só foram observadas na maior concentração;

2) Na análise da citotoxicidade pelo ensaio de crescimento celular, as diferenças entre os fármacos foram observadas ao final do tempo experimental quando a Pasta Guedes-Pinto não manteve a mesma capacidade de proliferação celular que o grupo controle na maior e menor concentração;

3) Os fármacos da terapia endodôntica de dentes decíduos não influenciaram na distribuição *in vitro* de proteínas da matriz extracelular (fibronectina, tenascina, colágeno I e osteonectina) e citoesqueleto (vimentina) de fibroblastos de polpa dental humana, uma vez que todas as proteínas estiveram presentes nas células quando analisadas pela técnica de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS[1]

American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Young Permanent Teeth. Pediatr Dent 2004;26: 115-9.

Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in Pediatric Dentistry by two experimental methods. Braz Dent J 2006;17(4):317-22.

Araújo OMB, Pereira MM, Pereira ES, Villamarin JC. Pulpotomias em dentes decíduos com emprego de formocresol diluído a 1/5 com a pasta Guedes-Pinto modificada - Observação clínica e radiográfica. Rev Odontoped 1995;4(4):75-80.

American Society for Testing and Materials. Annual BooK of ASTM Standards: medical devices. USA: West Conshohocken, 1992.

Bengtson AL, Bengtson NG. Nova conduta nas pulpectomias de dentes decíduos. Avaliação clínico-radiográfica do uso da pasta Guedes-Pinto. RGO 1994;42(1):7-11.

Bonow MLM, Guedes-Pinto AC, Bammann LL. Antimicrobial activity of drugs used in pulp therapy of deciduous teeth. Braz Endod J 1996;1(1):44-8.

Bourdon M, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Mathews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. Cancer Res 1983;43(6):2796-2805.

Brusco EHC, Perussolo B, Scapin HLC, Ferreira SLM. Procedimentos e substâncias empregados por faculdades de odontologia brasileiras na terapia endodôntica de dentes decíduos pulpectomizados. J Bras Odontopediatr Odontol Bebê 2002;5(26):35-46.

Byström A, Claessom R, Sudquvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985;1(5):170-5.

[1] De acordo com Estilo Vancouver Abreviatura de periódicos Segundo base de dados MEDLINE.

Castro MM. Observações clínico-radiográficas de molares permanentes jovens submetidos à pulpotomia e tratados com Pasta Guedes-Pinto. Rev Odontol Universidade Santo Amaro 1998;3(2):80-3.

Cerqueira DF, Mello-Moura ACV, Marques MM, Santos EM, Guedes-Pinto, AC. Análise da citotoxicidade de materiais utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos. Braz Oral Res 2007;21(suppl 1)(abstract Pb 184):223.

Cerqueira DF, Mello-Moura ACV, Santos EM, Guedes-Pinto, AC. Cytotoxicity, Histopathological, Microbiogical and Clinical Aspects of an Endodontic Iodoform-Based Paste Used in Pediatric Dentistry. J Clin Pediat Dent 2008;32(2):105-10.

Chang YC, Tai KW, Chou LS, Chou MY. Effects of camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells in vitro. J Endod 1999;25(12):779-81.

Chiquet M, Matthinsson M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. Biochem Cell Biol 1996;74(6):737-44.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascin a growing family of extracellular matrix proteins. Experientia 1995;51(9):853-62.

Chiquet-Ehrismann R, Kall P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. Tenascin interferes with fibronectin action. Cell 1988;53(6):383-90.

Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. Cell 1986;47(10):131-9.

Chiquet-Ehrismann R, Tannheimer M, Kich M, Brunner A, Spring J, Martin D, et al. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagens gels. J Cell Biol 1994;127(2):2093-101.

Doyle WA, McDonald RE, Mitchel DF. Formocresol versus calcium hydroxide in pulpotomy. J Dent Chil 1962;29:86-97.

Estrela C. Metodologia científica – ensino e pesquisa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001.

Estrela C, Bammann LL. Efeito enzimático do hidróxido de cálcio. Rev ABO Nac 1999;7(1):32-42.

Erausquin J, Muruzábal M. A method for root canal treatment in the molar of the rat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1967;24(4):540-6.

Fédération Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1980;30(2):140-88.

Fernandes AM, Silva GA, Lopes N Jr, Napimoga MH, Benatti BB, Alves JB. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;105(3):385-90.

Ferreira DCD, Brito DG, Gagioti SM, Cavalcanti BN, Rodrigues AV. Citotoxicidade de hidróxido de cálcio e pasta Guedes-Pinto em cultura de fibroblastos L929. Braz Oral Res 2007;21(suppl 1)(abstract Pb 192):223.

Freshney RI. Culture of animals cells. A manual of basic techniques. 4ª ed. Indianapolis, IN: Wiley-Liss; 1990.

Fuks AB. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. Dent Clinics North Am 2000;44(3):571-96.

Garbarsch C, Matthiessen ME, Olsen BE, Moe D, Kirkeby S. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. Histochem J 1994;26(2):110-8.

Garcia JM, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. Int Endod J 2003;36(6):404-10.

Garcia-Godoy F. Evaluation of an iodoform paste in root canal therapy for infected primary teeth. ASDC J Dent Child 1987; 54(1):30–4.

Goldeberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. J Dent 1995; 23(1):15-20.

Guedes-Pinto AC. Tratamento Endodôntico em Dentes Decíduos. In: Guedes-Pinto AC. Odontopediatria. 6ª ed. São Paulo: Editora Santos; 1988. cap 31, p. 535-55.

Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. Rev Assoc Paul Cir Dent 1981;35(3):240-5.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996;12(3):186-93.

Hikiba H, Watanabe E, Barrett JC, Tsutsui T. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. J Pharmacol Sci 2005;97(1):146-52.

Hillmann G, Geursten W. Light-microscopical investigation of the human distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. Cell Tissue Res 1997;289(1):145-54.

Holan G, Fuks AB. A comparison of pulpectomies using ZOE and KRI paste in primary molars: a retrospective study. Pediatr Dent 1993;15(6):403-7.

Holland CS, Hindle MO. The influence of closure or dressing of third molar sockets on post-operative swelling and pain. Br J Oral Maxillofac Surg 1984;22(1):65-71.

Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007;80(2):486-90.

Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. J Cell Biol 1982; 95 (2 Pt 1): 369-77.

International Agency for Research on Cancer. Press release no. 153. 15 June 2004. Disponível em URL http:// www.iarc.fr/pageroot/PRELEASES/pr153a.html [Aceso em 01/05/2009].

International Organization for Standardization (ISO). Dentistry -- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry -- Test methods for dental materials Technical Report 7405. Genebra: International Organizantion for Standardization, 1997.

Jeng HW, Feigal RJ, Messer HH. Comparison of the cytotoxicity of formocresol, formaldehyde, cresol, and glutaraldehyde using human pulp fibroblast cultures. Pediatr Dent 1987;9(4):295-300.

Jerrell RG, Ronk SL. Developmental arrest of a succedaneous tooth following pulpectomy in a primary tooth. J Pedod 1982;6(4):337-42.

Karjalainen S, Söderling E, Pelliniemi L, Foidart M. Imunohistochemical localization of types I and III and fibronectin in dentine of carious human teeth. Arch Oral Biol 1986;31(12):801-6.

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral. Texto – atlas – correlações clínicas. 2ªed. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan; 2004.

Kitasako Y, Shibata S, Fox CF, Tagam J. Location, arrangement, and possible function of interodontoblastics fibers in association with calcium hydroxide-induced hard tissue bridges. Int Endodon J 2002;35(12):996-1004.

Kopel HM. Root canal therapy for primary teeth. J Mich State Dent Assoc 1970; 52(2):28-33.

Kramer PF, Faraco-Junior IM, Feldens CA. Estado atual da terapia pulpar nas universidades brasileiras- pulpotomia e pulpectomia em dentes decíduos. J Bras Odontoped e Odontol Bebê 2000;3(13):222-9.

Kubota K, Golden BE, Penugonda B. Root canal filling materials for primary teeth: a review of the literature. ASDC J Dent Child 1992;59(3):225-7.

Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature 1980; 283(5744):249-256.

Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. Annu Rev Biochem 1982;51:219-50.

Lechner JH, Kalnitsky G. The presence of large amounts of type III collagen in bovine dental pulp and its significance with regard to them mechanism of dentinogenesis. Arch Oral Biol 1981;26(4):265-73.

Lesot H, Meyer JM, Ruch JV, Weber K, Osborn M. Immunofluorescent localization of vimentin, prekeratin and actin during odontoblast and ameloblast differentiation. Differentiation 1982;21(2):133-7.

Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. Dev Biol 1981; 82(3):371-81.

Linde A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. J Dent Res 1985;64(Spec No):523-9.

Lombardi T, Samson J, Mühlhauser J, Fiore-Donno G, Maggiano N, Castellucci M. Expression of intermediate filaments and actins in human dental pulp and embryonic dental papilla. Anat Rec 1992;234(4):587-92.

Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. J Dent Res 1991;70(1):19-26.

Lyall JB. Third molar surgery: the effect of primary closure, wound dressing and metronidazole on postoperative recovery. J R Army Med Corps 1991;137(2):100-3.

Mackie EJ, Thesllef I, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and prometes chondrogeneseis in vitro. J Cell Biol 1987;105(6):2569-79.

Magnusson B. Therapeutic pulpotomy in primary molars – clinical and histological follow-up. I. Calcium hydroxide paste as a wound dressing. Odontologica Revy 1970;21(4):415–31.

Mani SA, Chawla HS, Tewari A, Goyal A. Evaluation of a calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. ASDC J Dent Child 2000;67(2):142-7, 83.

Martinez EF, Araújo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. Int Endod J 2004;37(11):749-55.

Martinez EF, Souza SO, Corrêa L, Araújo VA. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin and type III collagen in human dental pulp. J Endod 2000; 26(12):708-11.

Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. Lab Invest 1983;48(6):656-77.

Mass E, Zilberman UL. Endodontic treatment of infected primary teeth, using Maisto's paste. ASDC J Dent Child 1989;56(2):117-20.

Mello-Moura ACV. Avaliação da estabilidade física de formulações da Pasta Guedes-Pinto desenvolvidas com diferentes excipientes [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. Int Endod J 2008;41(11):933-8.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. Cell 1982;31(1):11-24.

Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. Int J Paediatr Dent 2004;14(6):417-24.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55-63.

Moxham BJ, Webb PP, Benjamin M, Ralphs JR. Changes in the cytoskeleton of cells within the periodontal ligament and dental pulp of the rat first molar tooth during ageing. Eur J Oral Sci 1998;106(Suppl 1):376-83.

Murray PE, García-Godoy C, García- Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2007;12(3):E258-66.

Nielsen CJ, Bentley JP, Marshall FJ. Age-related changes in reducible crosslinks of human dental pulp collagen. Arch Oral Biol 1983;28(8):759-64.

Nurko C, Garcia-Godoy F. Evaluation of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth. J Clin Pediatr Dent 1999;23(4):289–94.

Nurko C, Ranly DM, García-Godoy F, Lakshmyya KN. Resorption of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth: a case report. Pediatr Dent 2000;22(6):517-20.

Ortega KL, Rezende NPM, Araújo NS, Magalhães MHCG. Effect of a topical antimicrobial paste on healing after extraction of molars in HIV positive patients: Randomised controlled clinical trial. Br J Oral Maxillofacial Surg 2007;45(1):27-9. Epub 2006 Feb 17.

Paiva JG, Antoniazzi JH. Estudos das alterações pulpares e periapicais. Diagnóstico. In: Paiva JG, Antoniazzi JH. Bases para a prática clínica. 2ª.ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.

Pellissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Evolution of cytokeratin expression in developing human tooth germ. Biologie Buccale 1990;18: 99-108.

Piva F, Faraco-Junior IM, Estrela C. Antimicrobial Activity of Different Root Canal Filling Pastes Used in Deciduous Teeth. Mater Res 2008;11(2):171-3.

Puppin-Rontani RMP, Peters CF, Worliczeck AT. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com necrose pulpar. Rev Assoc Paul Cir Dent 1994;48(1):1235–8.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Reviewing pulp treatment for primary teeth. J Am Dent Assoc 1991;122(10):83-5.

Ranly DM, Garcia-Godoy, F. Current and potencial terapies for primary and young primary teeth. J Dent Child 2000; 28(3):153-61.

Rifkin A. A simple, effective, safe technique for the root canal treatment of abscessed primary teeth. ASDC J Dent Child 1980;47(6):435–41.

Ruegg CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkann SS. Tenascin, an extra cellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. Proc Natl Acad Scie USA 1989; 86(19):7437-7441.

Sadrian R, Coll JA. A long-term followup on the retention rate of zinc oxide eugenol filler after primary tooth pulpectomy. Pediatr Dent 1993;15(4):249-53.

Santos EM. Ação Análise da citotoxicidade in vitro de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1998.

Santos EM. Ação da pasta Guedes Pinto e do hidróxido de cálcio: avaliação histopatológica da reação do subcutâneo de ratos e da atividade quimiotática in vitro de macrófagos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Santos EM, Bussadori SK, Araújo VC, Guedes-Pinto AC. Avaliação da citotoxicidade e da capacidade reparacional *in vitro* de fármacos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos. Braz Oral Res 2005;19(suppl)(abstract Pc 141):220.

Schroeder U. A 2-year follow-up of primary molars pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium hydroxide. Scandanavian J Dent Res 1978;39:273–8.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res 1985;64(Spec No):541-8.

Scott Pg, Veis A. The cyanogen bromide peptides of bovine soluble and insoluble collagen II. Tissue specific cross-linked peptides of insoluble skin dentin collagen. Conn Tissue Res 1986; 4(2):117-129.

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferantiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol 1991;36(2):117-28.

Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues?. Oral Dis 2004;10(2):63-74.

Siqueira Júnior JF, Lopes HP. Hidróxido de cálcio em endodontia: Suposições x Comprovação científica. RBO 1997;54(4):186-93.

Siqueira Júnior JF, Magalhães KM, Roças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2,5% NaOCl as an irrigant and Calcium Hydroxide/Camphorated Paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. J Endod 2007;33(6):667-72.

Spedding RH. Incomplete resorption of resorbable zinc oxide root canal fillings in primary teeth: report of two cases. ASDC J Dent Child 1985;52(3):214-6.

Spring J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R. Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. Cell 1989;59(2):325-34.

Srinivasan V, Patchett LC, Waterhouse PJ. Is theres life after Buckley's formocresol? Part I- A narrative review of alternative interventions and materials. Int J Paeditr Dent 2006;16(2):117-27.

Steinert PM, Roop D. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Ann Rev Biochem 1988;57:575-609.

Sweet, CA. Treatment and maintenance of pulpless deciduous teeth. J Am Dent Assoc 1935;22:1972-5.

Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. Pediat Dent 1995;17(5):351-5.

Thesleff I, Mackie E, Vainio S, Chiquet-Ehrismann R. Changes in distribution of tenascin during tooth development. Development 1987;101(2):289-96.

Thesleff I, Vainio S, Jalkalen M. Cell matrix interactions in tooth development. Int J Dev Biol 1989;33(1):91-7.

Tsui-Hsien H, Shinn-Jyh D, Chia-Tze K. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006;80B(2):486-90.

Tucker RP, Moiseiwitsch JRD, Lauder JM. In situ localization of tenascin mRNA in developing mouse teeth. Arch Oral Biol 1993; 38(12): 1025-99.

Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp. Arch Oral Biol 1984;29(2):93-9.

Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. Arch Oral Biol 1983;28(4):339-45.

Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM, Soames JV. Primary molar pulp therapy-histological evaluation of failure. Int J Paediatr Dent 2000;10(4):313-21.

Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. Pediatr Dent 1994;16(2):102–6.

Yacobi R, Kenny DJ, Judd PL, Johnston DH. Evolving primary pulp therapy techniques. J Am Dent Assoc 1991122(2):83-5.

Yamada KM, Olden K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 1978;275(5677):179-84.

Yoshiba K, Yoshiba N, Iwaku M, Nakamura H, Ozawa H. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer in human teeth. Arch Oral Biol 1994;39(5):395-400.

Yoshiba K, Yoshiba N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during dentinogenesis in huma teeth alter pulp camping with calcium hydroxide. J Dent Res 1996;75(8):1590-7.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 130/07

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"ESTUDO IN VITRO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR (FIBRONECTINA, TENASCINA, COLÁGENOS I E III E OSTEONECTINA) DE FIBROBLASTOS DA POLPA DENTAL APÓS EXPOSIÇÃO A FÁRMACOS UTILIZADOS NA TERAPIA ENDODÔNTICA DE DENTES DECÍDUOS: PASTA GUEDES-PINTO, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E M.T.A",** de responsabilidade da Pesquisadora **DANIELLA FERRAZ CERQUEIRA,** sob orientação do Professor Doutor **ANTONIO CARLOS GUEDES-PINTO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 04 de março de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O.