

DANIELI COLAÇO RIBEIRO SIQUEIRA

Análise da citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em culturas de macrófagos murinos

São Paulo

2010

DANIELI COLAÇO RIBEIRO SIQUEIRA

Análise da citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em culturas de macrófagos murinos

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo

2010

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Siqueira, Danieli Colaço Ribeiro

Análise da citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em culturas de macrófagos murinos / Danieli Colaço Ribeiro Siqueira; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2010.

157p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

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

1. Hipoclorito de sódio – Citotoxicidade. 2. Digluconato de clorexidina – Citotoxicidade. 3. Endoquil – Citotoxicidade. 4. Endodontia. I. Gavini, Giulio. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Siqueira, D.C.R. Análise da citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do Endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em culturas de macrófagos murinos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

"A vida nos trás muitas incertezas, porém um dia eu tive a mais intensa e desejada certeza..... seríamos UM para o resto de nossas vidas...."

*A você **DANILO** dedico este trabalho.*

Pelo amor incondicional e respeito pelas minhas escolhas

Por estar ao meu lado em todos os momentos...

..... principalmente nos mais difíceis

Por conhecer todos os meus defeitos.....E mesmo assim me amar!!

Meu amor, do tamanho do mundo e muito mais!!!!

***FELIPE e HELENA**, a continuação e o sentido da vida!*

A forma mais pura de amar

Pequenas estrelas que brilham em minha vida

Vocês fazem tudo valer a pena

Meus queridos filhos, amo vocês para sempre!!!!

*Agradeço a **DEUS** pela vida e saúde!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Diz uma antiga fábula que um camundongo vivia angustiado, com medo do gato.

Um mágico teve pena dele e o transformou em gato.

Mas ele ficou com medo de cão.

Por isso o mágico o transformou em pantera.

Então ele começou a temer os caçadores.

A essa altura o mágico desistiu.

Transformou-o em camundongo novamente e disse:

- Nada que eu faça por você vai ajudá-lo,
porque você tem apenas a coragem de um camundongo.

"É preciso coragem para romper com o destino que nos é imposto.

*Mas coragem não é a ausência do medo, e sim a capacidade de avançar, apesar do
medo."*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Giulio Gavini, obrigada pela
oportunidade de realizar este trabalho e por ter acreditado que eu
seria capaz. O seu otimismo me deu forças para começar o que eu
achava impossível e a tranqüilidade para me ajudar a chegar ao fim.*

Aos meus pais,

***JOÃO**, um exemplo de honestidade e meu eterno herói*

***ANA**, a que cuida e protege sempre. Uma grande amiga*

Obrigada por me acompanharem até aqui. Os caminhos ficam mais fáceis com a sabedoria de vocês. Meu amor eterno!

*A minha irmã **RENATA**, apesar da distância, sinto sua presença e seu amor dentro do meu coração todos os dias. Meu cunhado **MARCELO**, obrigada pelo carinho e por fazê-la feliz.*

*Ao meu sogro **NILSON** e minha sogra **VERA**, exemplos de união.*

Obrigada por me fazerem sentir o amor de uma "filha".

*Madrinha, **RENATA**, sem dúvida a melhor escolha que eu poderia ter feito! Tenho você como uma mãe! Deborah e Rodrigo, a extensão da nossa família.*

*Meus cunhados e cunhadas, **Ronis e Andréa, Rafael e Luciana** e meus queridos sobrinhos obrigada pelo carinho.*

PROFESSORA PRIMAVERA BORELLI

Uma pessoa maravilhosa....

Um exemplo de vida...

Abriu as portas do seu laboratório....

Me recebeu com carinho....

Permitiu que esta pesquisa fosse realizada....

Serei eternamente grata!

Obrigada

AMANDA RABELLO CRISMA

O maior exemplo de dedicação à pesquisa.

Seu compromisso com a Ciência faz de você uma pessoa especial.

Obrigada por ter me ensinado com tanta paciência

Por ter dedicado o seu tempo me ajudando

Com certeza, o pouco que sei sobre cultura celular, devo a você.

Tenha sempre a minha admiração!!!

AGRADECIMENTOS

Aos amigos **Renata Rodrigues de Almeida-Pedrin, Fernando Pedrin e Renata Aleixo**, pela amizade que se manteve, mesmo com a distância.

Ao amigo **Luciano Natividade Cardoso**, um grande amigo e parceiro. Obrigada pelas boas oportunidades.

Aos amigos professores da FMU, **Mariana Aguiar, Weber Bueno e Tiago Brum**, pelo companheirismo e por me ajudarem nos momentos finais dedicados à tese.

Aos **Professores do Departamento de Endodontia da FOUSP**, por me acolherem durante o doutorado, em especial ao **Professor Bombana** (*in memoriam*) pelo incentivo inicial.

À secretária do Departamento de Endodontia da FOUSP, **Ana Maria** pelo carinho e dedicação em todos os momentos do meu doutorado.

Às amigas do laboratório de Hematologia Clínica **Karina Nakajima, Mariana Cristina Ferreira Silva, Maria Carolina Borges e**

Graziela Batista da Silva, por fazerem meus dias de experimentos mais alegres e por estarem sempre disponíveis.

Aos Funcionários do Departamento de Endodontia da FOU SP, pelos serviços essenciais e pela cordialidade que sempre me dispensaram.

Aos Funcionários da Pós-graduação da FOU SP pelas orientações durante a pós-graduação e, principalmente nestes momentos finais.

Aos Funcionários da Biblioteca da FOU SP pelas orientações sobre a formatação deste trabalho e pelas correções do mesmo.

Ao Professor José Roberto Pereira Lauris (FOB USP), pela disponibilidade e atenção na orientação da análise estatística.

Ao Professor Gilberto Orivaldo Chierice, por ter gentilmente cedido o detergente derivado do óleo de mamona.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

Siqueira DCR. Análise da citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do Endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em culturas de macrófagos murinos, tese. São Paulo:Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Avaliou-se a citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do Endoquil e seus efeitos na liberação de citocinas e de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritonias murinos. As substâncias sofreram diluições de 1.000 e 10.000 vezes: Grupo Controle, meio de cultura meio McCoy's 5A[®] modificado e aprotinico; Grupo Hipoclorito de sódio a 1% (diluições A – 0,001 e B – 0,0001); Grupo Digluconato de Clorexidina a 2% (diluições A – 0,002 e B – 0,0002); Grupo Endoquil a 10% (diluições A – 0,01 e B – 0,001). Foram utilizados 70 camundongos da linhagem C57Bl/6j fêmeas. Após anestesia e sacrifício realizou-se a coleta do exudato celular por meio da injeção e aspiração de meio McCoy's 5A[®] modificado na cavidade abdominal dos animais. O ensaio da atividade citotóxica foi realizado pelo Método do MTT nos períodos: curto prazo (4 e 12 horas); médio prazo (24, 48 e 72 horas) e longo prazo (5 e 7 dias). A absorbância dos poços foi lida em Leitora de Elisa a 550 nm. Os valores obtidos foram comparados com os valores do padrão, calculando-se assim a viabilidade e o número de células presentes de cada grupo avaliado em função do tempo. A quantificação *in vitro* das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi realizada por meio de imunensaio do tipo Elisa, utilizando-se *kit* Quantikine[®] M murine. A análise da síntese de óxido nítrico foi conduzida segundo a metodologia de Griess, na qual o óxido nítrico é convertido a nitrito, sendo este último detectado colorimetricamente. Cada grupo experimental foi analisado em dois tempos de observação (24 e 48h), com estímulo de LPS ou não, em duplicatas. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância e, quando necessário, complementados pelo teste de Tukey. Após 12 horas, o grupo tratado com clorexidina na diluição A apresentou diminuição significativa da viabilidade celular em relação aos grupos tratados com hipoclorito de sódio e Endoquil; este declínio estendeu-se para 24, 48 e 72 horas quando provocou morte celular. Em 5 e 7 dias, ocorreu redução da viabilidade em

todos os grupos, com diferença significativa para o grupo da clorexidina. Em relação às citocinas e óxido nítrico: o hipoclorito de sódio e a clorexidina induziram a produção e exacerbaram o efeito do LPS sobre as IL-1 α e IL-1 β , respectivamente, enquanto que o Endoquil diminuiu estes efeitos; a clorexidina inibiu o efeito estimulatório do LPS, diminuindo a síntese de IL- 6; juntamente com o Endoquil, a clorexidina diminuiu a síntese de TNF- α , enquanto que o hipoclorito aumentou esta produção em 24 horas; mesmo estimulados com LPS, o hipoclorito e a clorexidina comprometeram a síntese de óxido nítrico, em 24horas e, após 48 horas, apenas a clorexidina manteve a inibição.

Palavras-chave: Irrigantes do canal radicular. Citotoxicidade. Hipoclorito de sódio. Clorexidina. Endoquil.

ABSTRACT

Siqueira DCR. Cytotoxicity analysis of 1% sodium hypochlorite, of 2% chlorhexidine digluconate and of Endoquil and its effects on release of cytokine and nitric oxide in cultured murine macrophages. [PhD Thesis] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

The cytotoxicity of 1% sodium hypochlorite, of 2% chlorhexidine digluconate and of Endoquil and its effects on cytokine release and nitric oxide were evaluated in culture of murine peritoneal macrophages. Substances were diluted 1,000 and 10,000 times: Control Group with culture medium using McCoy 5A's[®] modified and aprotogenic, Group Sodium Hypochlorite 1% (dilutions A - 0.001 and B - 0.0001); Group Chlorhexidine Digluconate 2% (dilutions A - 0.002 and B - 0.0002); Group Endoquil 10% (dilutions A - 0.01 and B - 0.001). 70 female mice of strain C57BL/6J were used. After anesthesia and sacrifice, middle McCoy's[®] 5A modified was injected in the abdominal cavity of animals and then the cellular exudate was aspirated. The cytotoxicity assay was performed by MTT method in the periods: short term (4 and 12 hours), medium term (24, 48 and 72 hours) and long term (5 to 7 days). The absorbance of the wells was read on ELISA reader at 550 nm. The values were compared with standard values, observing the viability and cell number in each group as a function of time. The *in vitro* quantification of cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α was performed using an ELISA-type immunoassay, using the kit Quantikine[®] M Murine. Analysis of nitric oxide synthesis was conducted according to the Griess assay, in which nitric oxide is converted to nitrite, the latter being detected colorimetrically. Each experimental group was analyzed at two time points (24 and 48h) with stimulation of LPS or not, in duplicates. The data were submitted to statistical analysis of variance and, where necessary, complemented by Tukey test. After 12 hours, the group treated with chlorhexidine with dilution A significantly decreased cell viability when compared to the groups treated with sodium hypochlorite and Endoquil. This decline has extended to 24, 48 and 72 hours, when cell death occurred. After 5 and 7 days occurred the reduction of viability in all groups, with significant differences for the chlorhexidine group. In relation to cytokines and nitric oxide: sodium hypochlorite and chlorhexidine induced the production and exacerbated

the effect of LPS on IL-1 α and IL-1 β , respectively, while Endoquil decreased these effects; chlorhexidine inhibited the stimulatory effect of LPS, reducing the synthesis of IL-6; just as Endoquil chlorhexidine decreased the synthesis of TNF- α , but hypochlorite increased production in 24 hours; even stimulated with LPS, sodium hypochlorite and chlorhexidine undertook the synthesis of nitric oxide in 24 hours and, after 48 hours only chlorhexidine kept inhibition.

Key words: Root canal irrigants. Cytotoxicity. Sodium hypochlorite. Chlorhexidine. Endoquil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Anestesia, administração do meio de cultura e massagem abdominal.....	61
Figura 4.2 – Aspiração, transferência e centrifugação da suspensão celular.....	62
Figura 4.3 – Contagem celular – azul de tripano 0,1%.....	63
Figura 4.4 – Distribuição na placa de cultura de 96 poços – MTT.....	65
Figura 4.5 – Plaqueamento celular – MTT.....	66
Figura 4.6 – Distribuição da placa de cultura de 24 poços - citocinas e NO.....	67
Figura 4.7 – Plaqueamento, incubação, lavagem e congelamento.....	68
Figura 4.8 – Curva-padrão e plaqueamento celular - MTT	70
Figura 4.9 – Distribuição na placa de cultura de 96 poços – NO.....	73
Figura 4.10 – Amostras congeladas e plaqueamento celular – NO.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 4h.....	80
Gráfico 5.2 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 12h.....	80
Gráfico 5.3 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 24h.....	81
Gráfico 5.4 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 48h.....	81
Gráfico 5.5 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 72h.....	82
Gráfico 5.6 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 5 dias.....	82
Gráfico 5.7 – Concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 7 dias.....	83
Gráfico 5.8 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição A (24h).....	86
Gráfico 5.9 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição B (24h).....	87
Gráfico 5.10 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição A (48h).....	89
Gráfico 5.11 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição B (48h).....	89
Gráfico 5.12 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição A (24h).....	93

Gráfico 5.13 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição A (48h).....	94
Gráfico 5.14 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição B (24h).....	94
Gráfico 5.15 – Concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição B (48h).....	95
Gráfico 5.16 – Concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição A (24h).....	98
Gráfico 5.17 – Concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição B (24h).....	98
Gráfico 5.18 – Concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição A (48h).....	100
Gráfico 5.19 – Concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição B (48h).....	101
Gráfico 5.20 – Concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição A (24h).....	104
Gráfico 5.21 – Concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição B (24h).....	104
Gráfico 5.22 – Concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição A (48h).....	106
Gráfico 5.23 – Concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição B (48h).....	107

Gráfico 5.24 – Concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição A (24h).....110

Gráfico 5.25 – Concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição A (48h).....111

Gráfico 5.26 – Concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição B (24h).....111

Gráfico 5.27 – Concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição B (48h).....112

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Média e desvio padrão das concentrações de MTT (nºcel/mL) em todos os grupos estudados, na diluição A.....	75
Tabela 5.2 – Média e desvio padrão das concentrações de MTT (nºcel/mL) em todos os grupos estudados, na diluição B.....	76
Tabela 5.3 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (nºcel/mL) em 4h e 12h.....	76
Tabela 5.4 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (nºcel/mL) em 4h e 12h.....	77
Tabela 5.5 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (nºcel/mL) em 24h, 48h e 72h.....	78
Tabela 5.6 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (nºcel/mL) em 24h, 48h e 72h.....	78
Tabela 5.7 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (nºcel/mL) em 5 e 7 dias.....	79
Tabela 5.8 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (nºcel/mL) em 5 e 7 dias.....	79
Tabela 5.9 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-1 α (pg/ml) em todos os grupos estudados.....	84
Tabela 5.10 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição A.....	85

Tabela 5.11 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição B.....	86
Tabela 5.12 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição A.....	88
Tabela 5.13 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição B.....	88
Tabela 5.14 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-1 β (pg/ml) em todos os grupos estudados.....	91
Tabela 5.15 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator Substância para a IL-1 β (pg/ml).....	92
Tabela 5.16 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator Substância para a IL-1 β (pg/ml).....	93
Tabela 5.17 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-6 (pg/ml) em todos os grupos estudados.	96
Tabela 5.18 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição A.	97
Tabela 5.19 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição B.	97
Tabela 5.20 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição A.	99
Tabela 5.21 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição B.	100

Tabela 5.22 – Média e desvio padrão das concentrações de TNF- α (pg/ml) em todos os grupos estudados.	102
Tabela 5.23 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição A.....	103
Tabela 5.24 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição B.	103
Tabela 5.25 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição A.....	105
Tabela 5.26 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição B.....	106
Tabela 5.27 – Média e desvio padrão das concentrações de NO (μ M) em todos os grupos estudados.....	108
Tabela 5.28 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator LPS.....	108
Tabela 5.29 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, dos fatores Substância e Diluição (A).....	109
Tabela 5.30 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, dos fatores Substância e Diluição (B).....	110

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
BHI	Brain heart infusion
CO ₂	Dióxido de Carbono
COB	Cimento à base de óleo de mamona
COP	Polímero do óleo de mamona
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EDTA-P	Ácido Etilenodiamino Tetracético associado ao Perborato de sódio
EDTA-T	Ácido Etilenodiamino Tetracético- Tergentol
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTAD	Composto a base de isômero de tetraciclina, ácido cítrico e Tween 80
MTT	Brometo de 3 -(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

NaNO ₂	Nitrito de Sódio
nm	nanometro
NO	Óxido Nítrico
n°cel/mL	número de células por mililitro
°C	grau Celsius
pg/mL	picograma por mililitro
PMA	Forbol-12-acetato-13-miristato
RPM	rotações por minuto
SDS	Docécil Sulfato de Sódio
SDS	dodecil sulfato de sódio a 20% em uma solução de HCl a 0,01M
TNF	Fator de Necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
3 PROPOSIÇÃO	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1 Animais.....	57
4.2 Grupos Experimentais.....	57
4.3 Obtenção do Material Biológico.....	59
4.4 Citotoxicidade.....	68
4.5 Síntese de Citocinas.....	70
4.6 Síntese de Óxido Nítrico.....	72
4.7 Análise dos Resultados.....	74
5 RESULTADOS	75
6 DISCUSSÃO	113
7 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICES.....	138
ANEXO.....	157

1 INTRODUÇÃO

O tratamento do sistema de canais radiculares, desde o estabelecimento do correto diagnóstico até a preservação do caso, constitui-se de atos operatórios interligados, não podendo qualquer dessas etapas ser negligenciadas. O preparo químico-cirúrgico procura romper o equilíbrio do ecossistema microbiano associado à remoção completa do tecido presente no interior do sistema de canais radiculares, resultando em espaço adequado para a obturação, manutenção da saúde periapical ou, em casos de lesão preexistente, promover um ambiente favorável ao reparo periapical.

Embora a ação dos instrumentos desempenhe um papel importante no tratamento endodôntico, deve-se considerar a complexidade da anatomia interna dos canais radiculares que impede o acesso dos mesmos em algumas áreas. Desta forma, a limpeza do canal depende também da ação das soluções irrigadoras, que por meio do somatório de suas propriedades químicas, físicas e biológicas promoverão a tão almejada desinfecção deste sistema.

A reparação dos tecidos periapicais depende essencialmente da eliminação de microorganismos, utilizando substâncias que sejam biologicamente compatíveis e que promovam a manutenção da integridade da região apical.

Diante disso, soluções químicas dotadas de propriedades antimicrobianas têm sido propostas, com especial destaque ao hipoclorito de sódio, ao digluconato de clorexidina e, mais recentemente ao detergente derivado do óleo de mamona (Endoquil).

No entanto, independentemente do tamanho do forame apical, da profundidade de penetração da agulha de irrigação ou técnica de instrumentação

utilizada, a extrusão de debris e irrigantes pode ocorrer, promovendo uma inflamação periapical e dor pós-operatória.

Uma vez extravasadas, as soluções irrigadoras penetram nos tecidos desencadeando mecanismos celulares incluindo alterações vasculares, ativação de células inflamatórias, expressão de mediadores químicos e retardando o processo de reparo celular.

Os aspectos biológicos das soluções irrigadoras estão diretamente ligados ao uso clínico das mesmas e testes de citotoxicidade *in vitro* tem sido amplamente utilizados para uma avaliação inicial do comportamento biológico desses materiais em células de mamíferos e também para que novas formulações possam se tornar efetivamente de uso odontológico.

Os resultados utilizando métodos de cultura celular para avaliação da compatibilidade biológica têm mostrado que os materiais testados podem ser citotóxicos ou não, dependendo do tipo de teste e células empregadas.

Neste contexto, os macrófagos são células inflamatórias que possuem receptores de membrana com afinidade para opsoninas e quando na presença de certos irritantes, tornam-se metabolicamente ativados, aumentando a ação fagocítica e secretando produtos como enzimas proteolíticas, mediadores químicos, citocinas, óxido nítrico, entre outros.

As citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF- α , IL-1 e IL-6 são essências para dar início à defesa contra o patógeno e embora esta resposta imune seja importante, ela pode ser prejudicial se for muito intensa ou não for altamente regulada.

A ativação e liberação de óxido nítrico também fazem parte do mecanismo de ação dos macrófagos, sendo este relacionado com o desenvolvimento e manutenção de lesões periapicais.

Analisar a citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona (Endoquil) e conhecer os seus efeitos na liberação de citocinas e óxido nítrico em cultura de macrófagos murinos, assumem papel de grande relevância na tentativa de reconhecer a compatibilidade tecidual destas substâncias, favorecendo um tratamento endodôntico de alta qualidade técnica e biológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Um dos objetivos do tratamento endodôntico é evitar que o processo infeccioso localizado nos canais radiculares se espalhe para os tecidos periapicais. Toda a terapia deve ser executada em condições assépticas de maneira a se evitar também a introdução de contaminantes externos no sistema de canais radiculares.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro nem sempre conseguem atingir os microrganismos que se estabelecem nos canais radiculares. Sendo assim, as infecções que acometem estas regiões devem ser tratadas por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas irrigadoras antimicrobianas capazes de romper o equilíbrio do ecossistema microbiano e atuar no maior número de regiões do sistema de canais radiculares.

De modo geral, a solução irrigadora ideal deve apresentar elevada capacidade de umectação e poder de limpeza, ação de solvência, ação antimicrobiana e boa tolerância tecidual.

A seleção de uma solução irrigadora não deve ser aleatória e sim norteadas de acordo com o maior número possível destas propriedades desejáveis, exigindo do profissional o profundo conhecimento da substância eleita. Para elucidar e favorecer esta decisão, a busca por uma solução irrigadora ideal vem sendo o objetivo de inúmeros trabalhos de pesquisa.

A fase de irrigação/aspiração durante o preparo biomecânico é considerada por Leonardo e Leal (1991) uma das mais importantes do tratamento endodôntico. A irrigação exerce o papel fundamental na movimentação ou solubilização do tecido pulpar, na remoção dos microrganismos, seus produtos e subprodutos,

partículas teciduais ou estranhas ao canal e toxinas, permitindo a ação da medicação intracanal e conseqüentemente promover o reparo (Cohen; Burns, 1991; Leonardo; Leal, 1991).

As soluções irrigadoras devem exercer estas funções por meio do somatório de suas propriedades químicas, físicas, biológicas e microbianas, aliadas a um custo acessível aos profissionais da área. Dentro deste contexto, várias substâncias têm sido estudadas e preconizadas para utilização durante o tratamento endodôntico, dentre elas, destacam-se o hipoclorito de sódio e a clorexidina, ambos encontrados nas mais diversas concentrações.

O hipoclorito de sódio é usado por mais de décadas como auxiliar químico na desinfecção dos canais radiculares. É uma solução fortemente alcalina, que possui um duplo modo de ação: habilidade de dissolução de tecido necrótico, atribuída a esta alta alcalinidade e propriedade germicida, relacionada com a formação do ácido hipocloroso pela liberação de cloro ativo. A ação antibacteriana deste ácido ocorre por oxidação de enzimas bacterianas que leva à desorganização de seu metabolismo. Seu uso na terapia endodôntica foi sugerido por Walker (1936), e enfatizado pelos trabalhos de Grossman e Meiman (1941). Estes autores preconizaram inicialmente o uso da soda clorada a 5% como o solvente mais eficiente, tendo a capacidade de dissolver o tecido pulpar num período de 20 minutos a 2 horas.

A clorexidina sob a forma de sal (gluconato, acetato ou hidrocloreto) tem sido usada desde a década de 50 em diversas concentrações como antisséptico bucal nas formas de enxaguatório bucal, irrigante gengival, creme e gel dental.

Em um estudo *in vitro*, Rölla et al. (1971) verificaram que a clorexidina foi capaz de ser adsorvida pela hidroxiapatita, pela superfície dentária e pelas

mucosas salivares, sendo liberada lentamente e de acordo com a diminuição da concentração do ambiente. Os autores afirmaram que esta possível capacidade de formação de reservatórios de clorexidina na superfície dentária, liberada lentamente, poderia prevenir a colonização bacteriana e o desenvolvimento da placa dental.

A partir da década de 70, o interesse pela toxicidade das soluções irrigadoras passou a merecer atenção dos pesquisadores especial atenção. Em 1973, Spangberg et al., em um estudo clássico, definiram que a concentração de 0,5% do hipoclorito de sódio tem o mais baixo grau de toxicidade, porém, reduzidas propriedades antibacterianas. Já a 5%, apesar de eficiente agente antimicrobiano, apresentou a maior reação tóxica. Concluíram, também, que o requerido efeito antibacteriano começa a ocorrer a partir da concentração de 1%.

O efeito solvente do hipoclorito de sódio sobre tecido vivo e necrótico bovino foi testado por Gordon et al. (1981). Observaram que soluções a 1%, 3% e 5% utilizadas sobre tecido necrótico apresentaram efeitos similares: remoção de 90% do conteúdo necrótico após 5 minutos. Sobre tecido vivo a efetividade foi menor: a 1% dissolveu cerca de 37% do tecido pulpar e nas concentrações maiores a dissolução foi de 70%.

Ringel et al. (1982) compararam por meio de estudo in vivo a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,2% e hipoclorito de sódio a 2,5% em 60 dentes humanos com canais radiculares necrosados e lesão periapical visível radiograficamente. O efeito dos agentes irrigantes foi monitorado por meio de culturas aeróbicas e anaeróbicas, no início e final de cada tratamento. Após a análise dos resultados verificaram que, nestas concentrações, o hipoclorito de sódio se mostrou significativamente mais eficiente do que o gluconato de

clorexidina do ponto de vista antimicrobiano durante as irrigações nos tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar.

Pashley et al. (1985) avaliaram a citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 5,25% usando três modelos biológicos independentes. In vitro, concluíram que aumentando as concentrações do hipoclorito, aumentava progressivamente a hemólise das células. In vivo, em olhos de coelhos, o hipoclorito promoveu edema palpebral e hiperemia nos primeiros 30 minutos, reduzindo este efeito em 48 e 72 horas, porém sem retornar ao normal antes de 7 dias. Quando injetado por via intradérmica em ratos, sem diluição, ele produz hemorragia imediata local e ulcerações no tecido após 24 horas. Concluíram que apesar do hipoclorito de sódio a 5% ser clinicamente aceitável para o preparo biomecânico e muito efetivo como irrigante, deveria ser empregado de forma criteriosa tomando-se cautela para impedir a chegada dessa substância ao periápice, pois poderia causar severa reação inflamatória.

Ingle e Taintor (1985) defenderam que as soluções irrigadoras devem, por meio de suas propriedades, promover a dissolução tecidual, ter ação antimicrobiana e auxiliar na lubrificação dos canais. Para tanto, devem eliminar rapidamente ou destruir a microflora, neutralizar as substâncias tóxicas presentes, ser efetiva na presença de sangue e exudato, ser bem tolerada pelos tecidos, ter boa capacidade de penetração, não manchar as estruturas dentárias, ser de fácil obtenção e ter custo acessível.

Em função da existência de diversas marcas comerciais e concentrações do hipoclorito de sódio, em 1989, Simões et al. investigaram o poder bactericida destas soluções sobre as bactérias encontradas nos canais radiculares e a tolerância tecidual quando implantado em tubos de polietileno em tecido

conjuntivo de camundongos. Concluíram que, nas concentrações estudadas (0,5% e 1%) foi bem tolerado pelos tecidos; todas as soluções mostraram poder bactericida e o hipoclorito de sódio a 1% mostrou-se mais efetivo do que as diversas marcas comerciais do líquido de Dakin.

Independente da técnica endodôntica utilizada deve ser dada atenção para o uso seguro e apropriado das substâncias químicas. Reeh e Messer (1989), descreveram um caso clínico em que, durante o retratamento de um incisivo central superior, com uma perfuração no terço médio da raiz houve a penetração inadvertida do hipoclorito de sódio a 1%. O paciente relatou uma dor severa na região e observou-se o aparecimento de tumefação, subsequente desenvolvimento de fístula e, a longo prazo, a ocorrência de parestesia do assoalho e asa do nariz e da região infraorbital que perdurou por 15 meses.

Ingram (1990) relatou um incidente envolvendo o hipoclorito de sódio a 5,25% que atingiu acidentalmente os olhos de um paciente. Imediatamente foi realizada a irrigação da área com água por 10 minutos e encaminhamento para avaliação do oftalmologista. Observou-se um funcionamento normal da musculatura ocular, perda de células epiteliais da camada externa da córnea e edema da conjuntiva. Após o uso de solução oftálmica a base de antibiótico e esteróide, o paciente estava assintomático e com aspecto clínico de reparo total.

Vahdaty et al. (1993) investigaram a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,2% e a 2% e do hipoclorito de sódio a 0,2% e a 2% sobre o *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários de incisivos bovinos. Os espécimes foram preparados, esterilizados, colocados em meio de cultura, inoculado 0,1 mL da suspensão bacteriana e incubados por 6 dias a 37°C. Após este período os canais foram irrigados com 20mL de cada substância testada, secos e removeu-

se dentina da superfície radicular utilizando-se brocas de diâmetros crescentes (100, 100-300, 300-500 μm de profundidade). As raspas de dentina obtidas foram cultivadas para verificar a quantidade de bactérias remanescentes. Os resultados indicaram que tanto a clorexidina quanto o hipoclorito em concentrações iguais foram similares na redução dos microrganismos. Ocorreu diminuição significativa do número de bactérias nos primeiros 100 μm de profundidade, porém em acima de 50% das amostras houve manutenção da contaminação, evidenciando a importância do uso do curativo de demora entre as sessões.

Jeansone e White (1994), analisaram a ação do hipoclorito a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2%, em 62 dentes humanos com necrose pulpar recém extraídos. Após a abertura coronária, fez-se a primeira coleta do material contaminado do canal radicular seguida pela utilização das soluções em teste e a segunda coleta; a terceira coleta foi obtida após 24 horas de incubação em anaerobiose. Ambas soluções reduziram consideravelmente o número de UFC, sendo a clorexidina mais eficiente, porém sem diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que se o efeito antimicrobiano fosse o único requisito importante para uma solução irrigadora, a clorexidina seria o irrigante de escolha, sendo que sua baixa toxicidade não seria suficiente para compensar sua incapacidade de dissolver tecido pulpar.

Yesilsoy et al. (1995) testaram por meio de diluição em ágar, as soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, 2,5% e 5,25%), do Peridex® , gluconato de clorexidina a 0,12%, álcool e do Therasol, sobre os microrganismos: *S. Mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. micros*. Após a mensuração dos halos de inibição verificaram que o comportamento antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 5,25%, do Peridex® e do Therasol foi semelhante. Os efeitos tóxicos destas substâncias

foram avaliados por meio de sua injeção em tecido subcutâneo de guinea pigs e observados após duas horas, dois dias e duas semanas. Concluíram que o Peridex® e o Therasol têm bom potencial para serem usados como irrigantes em Endodontia, pois mostraram-se materiais pouco agressivos e com eficácia antimicrobiana. O hipoclorito de sódio na maiores concentrações assim como o gluconato de clorexidina promoveram a formação de granuloma de corpo estranho.

Com o objetivo de determinar, *in vitro*, se a clorexidina apresentava substantividade, White et al. (1997) utilizaram-na como solução irrigadora a 2% e a 0,12% durante a instrumentação de dentes humanos recém extraídos. Após o tempo máximo de observação de 72 horas, a clorexidina a 2% apresentou-se efetiva e, a 0,12%, o efeito residual foi detectado para os intervalos de 6 e 12 horas apenas.

Em 1998, Siqueira Jr et al. avaliaram o efeito antimicrobiano de diversas substâncias irrigadoras sobre quatro anaeróbios Gram-negativos produtores de pigmento negro e quatro bactérias anaeróbias facultativas por meio de teste de difusão em ágar. Todas as soluções foram capazes de inibir os microrganismos testados. De acordo com o diâmetro dos halos de inibição, os autores apontaram a seguinte ordem decrescente de atividade antimicrobiana: hipoclorito de sódio a 4%, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2%, clorexidina a 0,2%, EDTA a 17%, ácido cítrico a 10% e hipoclorito de sódio a 0,5%.

Silva (1999) em estudo *in vivo* determinou a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1% e da clorexidina a 2%, como irrigantes em dentes com canais radiculares infectados. As culturas microbianas foram avaliadas imediatamente após o uso das soluções e decorridos sete dias. Os resultados

mostraram que ambos possuíram potencial antimicrobiano, quando considerada sua ação imediata, entretanto a clorexidina foi mais eficiente na atividade residual de sete dias.

Leonardo et al. (1999) avaliaram, in vivo, a capacidade antimicrobiana e o efeito residual do gluconato de clorexidina a 2%. Em seus resultados comprovaram que a solução apresentou o efeito antimicrobiano quando usada como substância irrigadora e que possuía uma substantividade de 48 horas após a sua utilização.

Heling et al. (2001) analisaram in vitro o efeito antimicrobiano e a citotoxicidade do hipoclorito de sódio e do diclorosocianureto de sódio. Concluíram que ambos se mostraram efetivos como antimicrobianos, porém quanto maiores suas concentrações mais letais seus efeitos sobre as culturas de fibroblastos humanos.

Bianconcini e Gavini (2001) avaliaram a citotoxicidade do digluconato de clorexidina a 2,5% e a 5%, do hipoclorito de sódio a 1% e do soro fisiológico em subcutâneo de ratos. Após intervalos de 30 minutos, 6 horas e 24 horas da inoculação das substâncias, os animais foram sacrificados e classificou-se quanto ao potencial irritativo na ordem decrescente: clorexidinas a 5% e 2,5%, hipoclorito de sódio a 1% e soro fisiológico, com diferenças significantes entre os grupos, exceto entre as clorexidinas. Quanto ao fator tempo, o hipoclorito mostrou-se menos irritante que as clorexidinas aos 30 minutos e 24 horas, porém, no período de 6 horas todas se comportaram de forma semelhante.

Tanomaru Filho et al. (2002) propuseram-se a avaliar o reparo apical e periapical após o tratamento endodôntico de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica. 72 canais foram instrumentados e irrigados utilizando

as soluções de hipoclorito de sódio a 5,25% ou clorexidina a 2%. Algumas raízes foram obturadas imediatamente com Sealapex® e guta-percha e outras receberam curativo de hidróxido de cálcio por 15 dias e posterior obturação. Após 210 dias, os animais foram mortos para realização das análises microscópicas dos espécimes. O reparo histológico foi melhor nos dentes que permaneceram com curativo de demora do que naqueles obturados imediatamente após o preparo. Já em uma comparação entre as soluções testadas, a clorexidina se comportou de maneira superior ao hipoclorito de sódio.

Neste mesmo ano Basrani et al. observaram o comportamento de diversos materiais utilizados como medicação intracanal, entre eles a clorexidina em gel, solução ou associada ao hidróxido de cálcio. Observaram que a manutenção da clorexidina a 2% no canal radicular por uma semana promoveu uma atividade antimicrobiana residual contra *E faecalis*.

Sassone et al. (2003) avaliaram *in vitro*, a atividade antimicrobiana das soluções de clorexidina a 0,12%, 0,5% e 1% e do hipoclorito de sódio a 1% e 5% na presença ou não de carga orgânica (albumina sérica bovina – BSA). Os testes por contato demonstraram que a clorexidina a 0,12% não foi capaz de eliminar o *Enterococcus faecalis* em nenhum dos tempos testados independente da adição de BSA. A clorexidina a 1% eliminou todos os microrganismos independente do tempo e da adição de BSA, assim como com ambas as concentrações do hipoclorito de sódio. No teste por difusão em ágar, todas as concentrações de clorexidina foram superiores ao hipoclorito, que não apresentou atividade antimicrobiana quando o BSA foi adicionado, independentemente da cepa testada. Com estes resultados, concluíram que para uma eliminação microbiana eficiente seria necessária uma solução de clorexidina de concentração superior a

0,12% e que a adição de carga orgânica influenciou na atividade antimicrobiana das soluções testadas.

Em 2003, Öncag et al. verificaram as propriedades antimicrobianas e a toxicidade do hipoclorito de sódio a 5,25%, do gluconato de clorexidina a 2% e do gluconato de clorexidina a 0,2% mais cetrímide a 0,2% (Cetrexidin®). Após análises *in vitro*, para verificar a atuação dos agentes sobre o *Enterococcus faecalis* e *in vivo* avaliando o efeito antimicrobiano residual e os efeitos citotóxicos, os autores concluíram que a irrigação com as substâncias à base de clorexidina foram mais efetivas sobre as bactérias anaeróbias do que o hipoclorito de sódio, além de possuírem maior poder residual e menor efeito tóxico.

Como o mesmo objetivo de verificar a atividade antimicrobiana residual, Weber et al. em 2003, compararam o hipoclorito de sódio a 5,25% com a clorexidina a 2% ativados passivamente com ultra-som sobre o *Streptococcus sanguinis*. A capacidade antimicrobiana residual da clorexidina foi estatisticamente superior ao do hipoclorito, mantendo seu efeito por até 168 horas.

Por meio do método do MTT, Zhang et al. (2003) avaliaram a citotoxicidade de soluções irrigadoras e medicamentos comumente utilizados no tratamento endodôntico em cultura de fibroblastos. O MTAD mostrou-se menos citotóxico que o eugenol, peróxido de hidrogênio a 3%, pasta de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio a 5,25%, Peridex e EDTA. Porém mais citotóxico que o hipoclorito nas concentrações 2,63%, 1,31% e 0,66%.

Bonacorsi et al. (2004) realizaram um experimento para observar o comportamento citotóxico do digluconato de clorexidina em macrófagos murinos e seu efeito na indução de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. O ensaio de

citotoxicidade foi feito pelo método do MTT e a presença de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, pela conversão da peroxidase dependente em vermelho de fenol e pela reação de Griess, respectivamente. Seus resultados mostraram que inicialmente (1 hora) a toxicidade da clorexidina, na concentração de 20µg/ml reduziu a viabilidade celular comparada com o grupo controle; em 24 horas, mesmo em menor concentração (5µg/ml) a perda da viabilidade se manteve. A clorexidina não induziu a síntese ou liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos macrófagos. Quando estimulados com PMA a produção se manteve, porém a produção de óxido nítrico induzida pelo LPS foi reduzida. Concluíram que a clorexidina não possui atividade imunoestimulante e em concentrações sub-tóxicas não afeta a resposta dos macrófagos estimulados com PMA, mas interfere no receptor-dependente estimulado com LPS.

Ribeiro et al. (2004) investigaram a genotoxicidade do digluconato de clorexidina a 0,12% em sangue periférico de ratos e células da mucosa bucal. Os resultados mostraram que nesta concentração ela foi capaz de promover danos primários no DNA dos leucócitos e das células da mucosa, porém sem quebra de cromossomos ou perda de eritrócitos.

Em 2005, Hernandez et al. acrescentaram o gluconato de clorexidina a 0,12% ao cimento MTA ProRoot® com objetivo de verificar seu comportamento em fibroblastos e macrófagos de camundongos. Ocorreu a indução de apoptose nas duas células e diminuição das mesmas na fase S do ciclo celular (síntese de DNA). Consideraram, portanto que houve um aumento da citotoxicidade do cimento quando preparado com a clorexidina e que o aumento do efeito antimicrobiano vem acompanhado do aumento da toxicidade.

Burgos (2005) avaliou a citotoxicidade da solução de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações (10⁻⁴; 10⁻³; 10⁻²), sobre fibroblastos do ligamento periodontal. A diluição menos concentrada (10⁻⁴) se comportou de maneira semelhante ao controle, sem provocar morte celular após 3,5 e 7 minutos. A viabilidade celular foi reduzida na diluição 10⁻³, quando comparada ao controle e quando mais concentrado (10⁻²), o hipoclorito de sódio foi citotóxico nas culturas celulares.

O efeito citotóxico do hipoclorito de sódio nas concentrações 0,5%; 1,0%; 2,5% e 5,25% em culturas de células de osteoblastos humanos já estabelecidas foi observado por Fidalgo et al. (2007). As substâncias permaneceram em contato com as células por um período de 30 segundos após o que, observou-se 100% de morte celular e dissolução da membrana citoplasmática. Concluíram que em todas as concentrações testadas, o hipoclorito de sódio foi altamente tóxico e, cuidados deveriam ser tomados durante a irrigação a fim de evitar o extravasamento aos tecidos periapicais a ponto de inviabilizar células e dificultar o reparo tecidual.

Gomes-Filho et al. (2008) compararam a reação tecidual em subcutâneo de ratos frente ao uso de solução salina a 0,9%; hipoclorito de sódio a 2,5% e 5,25%; digluconato de clorexidina a 2% em solução e gel. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou pouca ou quase nenhuma reação tecidual inflamatória; a solução salina, a solução de clorexidina e o hipoclorito a 2,5% mostraram boa biocompatibilidade com discreta reação aos 14 dias, porém com reparo tecidual em 30 dias. O hipoclorito de sódio a 5,25% foi o mais irritante e o número de células inflamatórias permaneceu elevado entre 14 e 30 dias. O grupo tratado

com clorexidina gel apresentou uma resposta inflamatória moderada aos 14 dias, porém com declínio após 30 dias, sendo considerada similar aos demais grupos.

Silva et al. (2008) avaliaram o efeito causado pela associação do digluconato de clorexidina a 0,4% à pasta de hidróxido de cálcio (Calen) em cultura celular de macrófagos (RAW 264.7) utilizando os ensaios de viabilidade celular (MTT); dosagem de óxido nítrico e liberação de citocinas (IL 1- α e TNF- α). Verificaram que esta associação não alterou o comportamento celular, nem as propriedades antiinflamatórias da pasta, além de não promover benefícios dentro dos parâmetros testados.

Em 2009, Gül et al. investigaram os efeitos citotóxico e genotóxicos in vitro do hipoclorito de sódio em diversas concentrações sobre linfócitos humanos. As aberrações cromossomiais foram observadas em todos os tratamentos (0,030; 0,065; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 ;4 μ /mL) em 24 e 48 horas. Uma correlação significativa foi encontrada entre o aumento das concentrações de hipoclorito e a frequência de micronúcleos, células apoptóticas e células binucleadas.

Motta et al. (2009) reportaram um caso clínico onde o hipoclorito de sódio a 1,5% foi erroneamente injetado como solução anestésica durante um tratamento endodôntico de rotina. A substância se mostrou altamente irritante, com necrose de tecidos moles e parestesia da região que perdurou por 3 anos.

Em 2010, Navarro-Escobar et al. avaliaram a citotoxicidade do ácido cítrico a 15%, do ácido fosfórico a 5% e do hipoclorito de sódio a 2,5% em cultura de fibroblastos utilizando a metodologia do MTT nos períodos de 1, 6 e 4 horas em duas concentrações (0,1% e 0,5%). A porcentagem de células viáveis diminuiu consideravelmente acima de 24 horas em todos os grupos testados. Nas diluições

de 0,5%, os grupos dos ácidos cítrico e fosfórico apresentaram pequena porcentagem de viabilidade celular, quando comparados ao hipoclorito de sódio.

Simbula et al. (2010) compararam a citotoxicidade do EDTA associado ao perborato de sódio com o hipoclorito de sódio a 5,25% em cultura de fibroblastos (L929). Ambos induziram a diminuição da viabilidade celular, porém o EDTA-P se mostrou menos citotóxico que o hipoclorito nesta concentração e neste modelo experimental.

Também neste ano, Gomes-Filho et al. (2010) realizaram um experimento para avaliar a resposta tecidual frente a implantação de tubos de polietileno em subcutâneo embebidos com hipoclorito de sódio a 2,5% e dispersão de nanopartículas de prata. Os períodos de avaliação foram 7, 15, 30, 60 e 90 dias, após o que, os animais foram sacrificados, os tubos removidos e preparados para avaliação microscópica. Os resultados mostraram que ambos materiais causaram reações moderadas em 7 dias e resposta similar ao controle aos 15 dias. Concluindo, portanto que este novo material é biocompatível quando comparado com o hipoclorito de sódio a 2,5%, porém outros estudos seriam necessários para confirmação destes achados.

Esta procura por novos produtos, principalmente de origem animal, vegetal ou mineral tem sido atualmente enfocada em todas as áreas de pesquisa e recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Uma destas substâncias é um polímero derivado do óleo de mamona (*Ricinus communis*) de autoria do professor Gilberto Orivaldo Chierice, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo-USP. Seu invento recebeu aprovação da Food and Drug Administration (FDA), responsável pela liberação de novos medicamentos e alimentos nos Estados Unidos da América, abrindo as portas para inúmeras

pesquisas utilizando todos os derivados passíveis de serem produzidos com esta matéria-prima.

A mamoneira é uma planta de origem tropical, resistente à seca e exigente em calor e luminosidade. Seu fruto apresenta aproveitamento integral, obtendo-se como produto principal da sua industrialização o óleo, estável sob várias condições de temperatura e pressão, e como subproduto a torta, a qual pode ser utilizada como adubo orgânico. O óleo pode ser utilizado na fabricação de tintas, corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes, colas e aderentes, náilon e matéria plástica. Pode ser utilizado na produção de biodiesel e como base na manufatura de cosméticos e drogas farmacêuticas.

Na área médica vem sendo largamente estudado e empregado devido a sua biocompatibilidade com os tecidos vivos, nos casos de necessidades de colocação de próteses em pacientes vítimas de acidentes e tumores. O potencial bactericida e fungicida do biomaterial incentivou a realização de novas pesquisas em outras áreas, criando mais dois produtos indicados para o uso odontológico: o Endoquil, usado como solução irrigadora em Endodontia e o Perioquil, aplicado na Periodontia.

Utilizando um cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea produzida em antebraços de coelhos, Ignácio (1995), verificou por meio de análise radiográfica, macroscópica e histológica que este polímero se comportou como um osteocondutor, sem reação tóxica nos tecidos adjacentes e sem atividade fagocitária.

Araújo et al., em 1996, avaliaram o processo de cicatrização alveolar de dentes de ratos extraídos após o implante de resina natural derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*). Os resultados obtidos mostraram uma progressiva

neoformação óssea, paralela a um decréscimo de volume de tecido conjuntivo e da cápsula fibrosa ao redor do implante.

Sugimoto (1997) avaliou microscopicamente, em macacos, a reação do tecido ósseo na presença do implante de polímero de mamona. Foram utilizados oito macacos, que receberam sobre o mento, implantes pré-confeccionados, autoclavados e fixados com parafusos de titânio. Quatro implantes tinham somente uma perfuração central utilizada para fixação e os outros quatro, aproximadamente 12 perfurações, além da central. Após o período de cinco meses, os animais foram mortos e os espécimes processados e corados em hematoxilina-eosina. A análise microscópica mostrou que o polímero de mamona foi biocompatível, porém, não induziu neoformação óssea nas áreas marginais e no interior dos implantes.

A biocompatibilidade do polímero da mamona no interior do alvéolo dental de ratos foi testada por Lamano Carvalho et al. (1997). O exame microscópico revelou grânulos do polímero localizados no terço cervical, circundados por delgada cápsula conjuntiva sem reação de corpo estranho. A análise histométrica evidenciou o adelgaçamento da cápsula conjuntiva e o aumento da neoformação óssea. Ao final de seis semanas, as áreas-teste apresentavam-se quase que totalmente preenchidas por tecido ósseo maduro e, apesar da presença de uma cápsula bastante delgada, o trabeculado ósseo estabelecia, em vários locais, íntimo contato com o material implantado. Concluíram que o material testado foi biocompatível, sendo progressivamente osseointegrado no decorrer do reparo.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas visando a reconstrução de tecidos ou órgãos comprometidos e, embora algumas vezes possam ser aplicadas com sucesso, apresentam muitas limitações. Assim como nas áreas médicas, as áreas

odontológicas que envolvem cirurgia bucomaxilofacial e periodontal, têm grande interesse no desenvolvimento de biomateriais. Bonini (1999) realizou um estudo verificando a resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona em cultura de macrófagos peritoniais provenientes de camundongos da linhagem C57BL/6J. O material revelou-se não-citotóxico ao interagir com os macrófagos, com pequena reação de corpo estranho, com liberação de NO em níveis relativamente baixos. Concluiu que a poliuterana derivada do óleo de mamona apresentou comportamento favorável a biocompatibilidade.

Tendo em vista as excelentes propriedades biológicas do polímero da mamona, Ferreira et al. (1999) utilizaram pela primeira vez o detergente de mamona na Endodontia para a verificação de sua atividade antimicrobiana. Em um estudo in vivo, os autores compararam a atividade antimicrobiana do gel de Papaína a 0,4%, detergente derivado do óleo de mamona a 10% e hipoclorito de sódio a 0,5%, em dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. Em seus resultados encontraram ação antimicrobiana nas três soluções testadas. O gel de papaína a 0,4% apresentou o menor efeito, enquanto que o detergente de mamona a 10% e o hipoclorito a 0,5% mostraram-se com ações antimicrobianas semelhantes.

Ainda neste ano, Ferreira realizou um trabalho com o objetivo de padronizar o teste de diluição em caldo para determinação da susceptibilidade de anaeróbios estritos frente a agentes irrigadores tradicionais e emergentes, empregados no tratamento endodôntico. Utilizou-se o detergente derivado do óleo de mamona a 10%, o digluconato de clorexidina a 2%, paramonoclorofenol canforado a 35% e solução de hidróxido de cálcio a 10% sobre cepas de referência de *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium*

perfringens. O autor concluiu que por meio da padronização do método da macrodiluição em caldo, a clorexidina foi a droga que demonstrou melhor eficiência, com as menores concentrações inibitórias mínimas, seguida pelo detergente de mamona, paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio. A eficácia de cada droga variou para as diferentes bactérias. O *Clostridium perfringens* exibiu maior resistência que a *Prevotella intermedia* e o *Fusobacterium nucleatum*, cujas concentrações bactericidas mínimas, foram em geral semelhantes para as diferentes drogas.

Garcia Jr (2000) estudou comparativamente a reparação óssea em defeitos cirúrgicos realizados na parede anterior do seio maxilar após a osteotomia e a colocação de implantes de polietileno poroso de alta densidade – Medpor; de poliuretana de mamona; e de matriz óssea desmineralizada bovina. As análises foram feitas após 145 dias de implantação por meio de avaliações histológicas e histométricas utilizando método de microscopia óptica computadorizada. O melhor comportamento foi observado no grupo da matriz óssea bovina, seguido do Medpor e da poliuretana de mamona, a qual respondeu com intensa fibrose e moderado infiltrado inflamatório crônico tardio.

Leonardo et al (2001) analisaram, in vitro, o poder antimicrobiano do detergente de mamona (Endoquil), da clorexidina a 2% e do hipoclorito a 0,5%, frente às bactérias Gram positivas (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e ao fungo *Cândida albicans*. O inóculo dos microrganismos foi obtido em caldo de BHI ou caldo de Muller Hinton incubados a 37°C por dois dias. Sobre as placas de Petri com meio de cultura e microrganismos, foram colocados discos

de papel embebidos com as substâncias a serem testadas e, incubadas a 37°C por 24 horas. O poder antimicrobiano das soluções irrigadoras foi avaliado pela presença e tamanho dos halos de inibição ao redor dos discos de papel. Concluíram que todas as espécies bacterianas testadas foram inibidas pela clorexidina a 2%, enquanto que o Endoquil só se mostrou efetivo contra os microrganismos Gram positivos, e o hipoclorito de sódio a 0,5% sobre o *Staphylococcus aureus*.

Em 2001, Teixeira et al. estudaram a capacidade de remoção de smear layer dos canais radiculares empregando diferentes tipos de irrigantes endodônticos. Foram utilizados 20 dentes, distribuídos entre quatro grupos: EDTA a 17%, hipoclorito de sódio a 5,25%, Endoquil e tendo a água destilada empregada no grupo controle. Os dentes foram instrumentados e irrigados com as soluções em teste, clivados no sentido do seu longo eixo e preparados para a avaliação da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que os grupos do Endoquil e do EDTA promoveram maior capacidade de remoção da smear layer, não diferindo estatisticamente entre si.

Calixto (2001), testou a biocompatibilidade de um enxerto floculado de resina de mamona, utilizando-se como modelo experimental o reparo da ferida de extração dental de rato. A presença do material não suscitou uma resposta inflamatória persistente com quantidade discreta de células gigantes de corpo estranho aderidas à superfície, em todos os tempos estudados. Apresentou o mesmo padrão de reparo alveolar descrito para o controle, porém, com um atraso na ordem de 13 a 20% na neoformação óssea reparacional.

Pascon et al. (2001) compararam a toxicidade in vitro e in vivo do polímero da mamona com quatro materiais comerciais – AH26, Dentinol, Kerr Pulp Canal Sealer e Sealapex, com a finalidade de ser usado como cimento de obturação de canal. Observaram diferenças significantes entre os materiais, sendo o Kerr Pulp Canal Sealer apresentou in vitro a menor toxicidade. Entretanto, in vivo, verificou-se que todos os materiais, com exceção do polímero da mamona, apresentaram reação inflamatória que variava de moderada a severa. Concluíram, com esses resultados, que o polímero foi considerado um material compatível, apresentando condições biológicas para a sua utilização como material obturador de canal radicular.

Ribeiro (2003) verificou o comportamento clínico, radiográfico e histológico após o uso do implante de poliutera de mamona no espaço alveolar, após exodontia do terceiro pré-molar inferior de equinos. Após cicatrização, observou proliferação óssea acentuada e aumento da radiopacidade no final de experimento. O exame histológico do material revelou tecido ósseo compacto ou trabecular. Concluiu que, a poliutera derivada da mamona é inerte e exibe excelente biocompatibilidade para este modelo experimental.

Yamashita et al. (2004) avaliaram por meio da microscopia eletrônica de varredura, a característica da superfície dentinária após o preparo biomecânico utilizando diferentes regimes de irrigação. Trinta e seis dentes uniradiculados foram divididos em seis grupos experimentais: G1 – hipoclorito de sódio a 2,5%; G2 - hipoclorito de sódio a 2,5% + EDTA; G3 – clorexidina a 2%; G4 - clorexidina a 2% + EDTA; G5 – detergente de mamona; G6 - detergente de mamona + EDTA. Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos e concluíram que:

1. as superfícies das paredes dos canais apresentaram menos resíduos quando

se realizou o toailete final com EDTA; 2. os três irrigantes testados se comportaram de forma semelhante; 3. os melhores resultados foram observados no terço médio; 4. o detergente de mamona pode ser sugerido para novos estudos como irrigante endodôntico.

Siqueira (2005) avaliou comparativamente in vivo, o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10% (Endoquil) na irrigação de canais radiculares de 18 dentes humanos com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. As amostras foram colhidas em três tempos (inicial; após a instrumentação e 72 horas) e analisadas tanto em aerobiose como em anaerobiose. Baseados na análise dos resultados, concluiu-se que: todas as substâncias irrigadoras utilizadas mostraram uma redução significativa do número de bactérias da 1ª para a 2ª colheita, tanto em anaerobiose como em aerobiose, não sendo significativa apenas a clorexidina em aerobiose; da 2ª para a 3ª colheita houve um aumento considerável do número de bactérias, com diferença significativa entre as substâncias irrigadoras tanto em anaerobiose como em aerobiose, não sendo significativa apenas a clorexidina em aerobiose; a constatação do aumento do número de bactérias da 1ª para a 3ª colheita evidenciou que só o preparo biomecânico do canal radicular não foi suficiente para conter a recolonização bacteriana; em relação à 2ª colheita, as três substâncias irrigadoras se comportaram de maneira semelhante na redução do número de microrganismos; em relação à 3ª colheita em anaerobiose, a clorexidina a 2% e o detergente derivado do óleo de mamona a 10% foram significativamente melhores que o hipoclorito de sódio a 1% quanto à presença bacteriana.

Em 2006, Meneghin et al. estudaram por meio de análise morfológica e morfométrica, a capacidade de limpeza promovida pela instrumentação rotatória e irrigação com diferentes soluções: água destilada e deionizada; hipoclorito de sódio a 1% e detergente derivado do óleo de mamona a 3,3%. Verificaram que o detergente apresentou efetividade semelhante ao hipoclorito na remoção de debris dos canais radiculares.

O objetivo de Takano et al. (2007) foi investigar a inibição do desenvolvimento de fungos fitopatógenos pelo detergente derivado do óleo de mamona. Seus resultados mostraram que a substância possui efeito antifúngico provavelmente atribuído a danos causados na parede celular dos microrganismos, com a consequente perda de constituintes citoplasmáticos e mote celular.

Camargo et al. (2007), compararam a citotoxicidade e genotoxicidade de um novo cimento à base de óleo de mamona (COB) com o cimento à base de hidróxido de cálcio (Hydro C) e o MTA. Os resultados mostraram um efeito citotóxico apenas no grupo de Hydro C, pequena diminuição do número de células no grupo do MTA e indução da proliferação celular pelo cimento de mamona. Concluíram que, tanto o MTA quanto o COB devem ser considerados na escolha do material para o capeamento pulpar.

Shygei et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina gel a 2% , dos extratos naturais de mamona, glicólico de aloe Vera, glicólico de gengibre e da solução salina fisiológica estéril (controle) sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. As amostras foram coletas em três períodos e os resultados mostraram maior efetividade antimicrobiana do hipoclorito e da clorexidina, seguidos dos extratos

de mamona e glicólico de gengibre. O extrato glicólico de aloe Vera não apresentou atividade antimicrobiana.

Com os mesmos objetivos de investigar os efeitos antimicrobianos de soluções irrigadoras Miranda et al. (2008) compararam o extrato hidroalcoólico do Barbatimão, do Endoquil e da clorexidina a 2%. Todos os produtos tiveram ação antimicrobiana, porém, a solução de Barbatimão e o Endoquil necessitaram de concentrações mais elevadas do que a clorexidina para exercerem tal função.

Também, em 2008, Camargo avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade dos cimentos Acroseal, Epiphany, AH Plus e um novo cimento derivado do polímero da mamona (Polifil) sobre cultura de células pulmonares humanas transformadas e fibroblastos pulmonares de hamster chinês. O Acroseal foi o material mais citotóxico e genotóxico testado, seguido do Epiphany e AH Plus. O Polifil não apresentou citotoxicidade quando comparado com os demais, porém o autor sugere mais estudos para elucidar o mecanismo tóxico destes cimentos.

Martins et al. (2009) propuseram-se a avaliar a capacidade seladora do polímero do óleo de mamona (COP), do MTA e do cimento de ionômero de vidro (GIC) como materiais retro-obturadores. O grupo do COP apresentou o menor grau de infiltração e capacidade seladora superior ao MTA e GIC, que tiveram comportamento semelhante.

Considerando esta retrospectiva da literatura, observa-se o reduzido número de trabalhos avaliando a compatibilidade das soluções irrigadoras em modelos que reproduzam com maior fidelidade os fatos que ocorrem na região periapical.

O emprego de qualquer substância ou material de uso odontológico deve passar por testes de biocompatibilidade que podem ser definidos como a

capacidade destes produtos, uma vez aplicados no organismo, não ocasionarem reações adversas. A detecção da biocompatibilidade ou tolerância tecidual pode ser avaliada por testes de toxicidade experimentais iniciais realizados in vitro, utilizando cultura de tecidos ou células; testes secundários e testes de uso in vivo.

O cultivo celular apresenta vantagens como simplicidade técnica, facilidade de reprodução dos resultados, controle da padronização amostral, metodologia bastante sensível, de baixo custo, rapidez e respeito à bioética em comparação aos estudos in vivo (Hyakuna et al., 1989).

A instalação de um quadro inflamatório agudo gera uma série de eventos celulares e vasculares como vasodilatação, migração de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos) e liberação de mediadores, alguns dos quais desencadeiam dor.

A presença de agentes irritantes sejam de natureza física, microbiana ou química, tem capacidade de alterar a reparação tecidual. É claro que os fenômenos inflamatórios são importantes para a reparação e cura, mas, dependendo do grau de agressão, haverá uma resposta inflamatória na mesma proporção da injúria, podendo retardar o processo de reparação ou mesmo a não reparação.

Embora as soluções irrigadoras devam ser empregadas essencialmente no âmbito do sistema de canais radiculares, por mais cuidadosa que sejam as manobras de preparo do canal, existe a chance de extravasamento de líquidos e extrusão de material além do forame apical (Deonizio et al. 2002)

Grande importância tem sido dada à atividade dos macrófagos na progressão das reações inflamatórias periapicais, notadamente na indução e perpetuação de lesões periapicais. Esta atividade dos macrófagos está

relacionada tanto às respostas inflamatórias inespecíficas (fase aguda da inflamação) quanto aos quadros específicos (resposta imunológica envolvendo ativação de linfócitos) e ainda por tratar-se de uma linhagem de células essenciais para o processo de reparação.

Em 1986, Syrjänen et al., trabalhando em cultura de macrófagos, avaliaram a biocompatibilidade de limalhas de amálgama contendo prata e estanho e comprovaram a eficiência destas células no mecanismo de fagocitose, principalmente nos períodos iniciais ao contato célula-material analisado.

Stashenko (1990) demonstrou que além de elevada capacidade fagocitária, os macrófagos são responsáveis pela produção de várias substâncias biologicamente ativas como enzimas, prostaglandinas e citocinas. Estas últimas, por sua vez, são mediadores químicos produzidos por diferentes tipos celulares como macrófagos, polimorfonucleares, fibroblastos, linfócitos, osteoclastos entre outros e estão envolvidas no processo de reabsorções ósseas inflamatórias. A liberação de IL-1 (Interleucina-1), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), TNF- β (Fator de Necrose Tumoral- β) pelos macrófagos presentes nos quadros inflamatórios crônicos exercem um alto potencial reabsortivo. IL-1 β (Interleucina-1 β) apresenta potencial de ação 15 vezes maior que IL-1 α (Interleucina-1 α) e 1000 vezes maior que TNF- α .

O padrão celular em lesões apicais (granulomas e cistos) de dentes submetidos à apicectomia mostrou elevada colonização de macrófagos, justificada pelo fato de participarem tanto da resposta imune específica – comandada pelos linfócitos T-indutores mediante secreção de fator ativador de macrófagos –, quanto na resposta inespecífica, caracterizada pelo recrutamento de outros macrófagos para o sítio inflamatório (Kopp; Schwarting, 1989).

Lim et al. (1994) comprovaram que a presença da IL-1- β no infiltrado inflamatório periapical de processos gengivais e lesão periapical sintomática e assintomática representa mais de 60% da atividade de reabsorção óssea e também estimula a produção de outras citocinas como IL-2 (Interleucina-2), IL-3 (Interleucina-3), IL-5 (Interleucina-5), além de estar relacionada ao processo de dor, induzindo a liberação de metabólitos do ácido aracdônico.

Segundo métodos histoquímicos, Kawashima et al. (1996) observaram que as citocinas envolvidas em reabsorção óssea, IL-1 β e de TNF- β foram detectadas em lesões periapicais induzidas em modelos experimentais de dentes de ratos, indicando que o infiltrado de macrófagos é o principal responsável pela reabsorção óssea.

Koulaouzidou et al. (1999), empregaram soluções irrigantes de diferentes concentrações, EDTA neutro (15%, 1% e 0,1%), EDTA pH 7,4 (17%, 1% e 0,1%) e hipoclorito de sódio (2,25%, 1% e 0,1%), em cultura de fibroblastos e verificaram que as soluções testadas apresentaram reações citotóxicas intensas, exceto as soluções a 0,1% que exibiram citotoxicidade moderada.

O LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa das bactérias Gram-negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação (Dobrovolskaia; Vogel, 2002). Ele é capaz de ativar monócitos e macrófagos para produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, as quais, por sua vez, atuam como mediadoras endógenas da inflamação (Beutler ; Rietschel, 2003)

Segundo Fujihara et al. (2003) os macrófagos também secretam, em resposta ao LPS, outros mediadores biológicos, entre eles, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o ânion superóxido e óxido nítrico, respectivamente.

Além dos fatores externos já relatados, Lara et al. (2003) provaram que componentes protéicos da dentina são capazes de promover migração leucocitária de maneira dose e tempo-dependente e também desencadear aumento da concentração de NO, H₂O₂ e TNF- α . Pelos dados obtidos nas experimentações in vivo (injeção subcutânea) e ex vivo (cultura de macrófagos peritonias) em camundongos, os autores afirmam que a dentina pode induzir respostas inflamatórias assim como influenciar na patogenia das reabsorções radiculares inflamatórias.

Malheiros et al. (2005) compararam a citotoxicidade do EDTA a 17% em diluições de 0,1% e 0,5% e de três soluções com diferentes concentrações de ácido cítrico (10, 15 e 25%) em cultura de fibroblastos. Todas as soluções foram diluídas em meio de cultura a 0,1% e 0,5%. Em curto prazo, todos apresentaram viabilidade celular semelhante ao controle, exceto o EDTA a 17% em diluição de 0,5%. Já em longo prazo, permitiram crescimento celular contínuo e progressivo, exceto o EDTA a 17% e o ácido cítrico a 25% em diluições de 0,5%. O ácido cítrico não impediu o crescimento e a viabilidade celular, provando não ser citotóxico in vitro.

Amaral et al. (2006) avaliaram a síntese das interleucinas IL-1 β e TNF- α em culturas de macrófagos submetidas à presença de EDTA a 17% e ácido cítrico a 15%. Como resultados deste trabalho, não foram constatadas alterações significativas na síntese e liberação de IL-1 β na presença de nenhum dos irrigantes avaliados. No entanto, a liberação de TNF- α foi significativamente influenciada pelas soluções testadas. Tanto o EDTA quanto o ácido cítrico provocaram aumento da concentração de TNF- α , indicando que o extravasamento apical de irrigantes poderia provocar injúrias periapicais como a

indução e a ativação de macrófagos, além de desencadear mecanismos que promoveriam reabsorções ósseas periapicais.

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos agentes irrigantes, Amaral et al., em 2007, utilizaram cultura de macrófagos de linhagem primária, obtidas de camundongos Swiss. As culturas celulares condicionadas com diluições de 0,5% de EDTA a 17% e ácido cítrico a 15% em diferentes períodos de observação: curto prazo (0, 6, 12 e 24 horas) e médio prazo (1, 3, 5 e 7 dias). Ao término de cada período, a viabilidade celular era determinada pelo método MTT. Nas observações de curto prazo, o EDTA e o ácido cítrico mostraram efeitos citotóxicos significativos em relação ao grupo controle, pois houve uma redução significativa da população celular inicial. Provavelmente, estes agentes irrigantes possuem ação direta na cultura de macrófagos, alterando a superfície de membrana celular e potencializando a morte da célula. Já no ensaio de médio prazo, o ácido cítrico mostrou menor ação citotóxica quando comparado ao EDTA. Neste caso, as culturas celulares em contato com o EDTA apresentaram intensa redução da viabilidade das células, justificando sua alta citotoxicidade.

Ainda, para avaliar o comportamento destas células macrofágicas expostas às soluções de EDTA e ácido cítrico, Sales et al. (2008) avaliaram os níveis de NO (óxido nítrico) presente nas culturas celulares. O NO representa um dos metabólitos tóxicos sintetizados pelos macrófagos que estão em atividade fagocitária frente às injúrias e presença de agentes agressores nos tecidos periapicais e, portanto, são considerados coadjuvantes no processo de reabsorção óssea. Além disso, os autores estudaram as alterações morfológicas dos macrófagos em microscopia eletrônica de transmissão e no teste Annexin-V (corante que detecta a morte celular em níveis de organelas citoplasmáticas,

antes mesmo de haver comprometimento estrutural da célula). Como resultados desse trabalho, os pesquisadores concluíram que a cultura de macrófagos expostas às soluções de EDTA apresentaram níveis estatisticamente menores de NO em relação ao ácido cítrico e pela análise morfológica, as células tratadas com EDTA mostraram sinais evidentes e intensos de apoptose celular como condensação acentuada da cromatina nucleolar, núcleo apoptótico, citoplasma intensamente vacuolizado e perda estrutural da membrana celular.

O sucesso da terapia endodôntica está baseado na reparação tecidual, o que viabiliza o retorno do elemento dental à sua função. Para isso o processo de cura está na dependência da ausência de infecção e no grau de injúria dos tecidos lesados.

Sem dúvida, existem vários pontos em relação à atividade dos macrófagos que merecem ser pesquisados, principalmente no que se refere à atividade destas células diante dos diversos agentes químicos empregados em Endodontia, para posterior aplicação destes achados na prática clínica.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo objetiva analisar comparativamente a citotoxicidade do hipoclorito de sódio a 1%, do digluconato de clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona quando aplicados em cultura de macrófagos peritoneais, provenientes de camundongos da linhagem *C57Bl/6j*, utilizando ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT em curto prazo (4 e 12 horas); médio prazo (24, 48 e 72 horas) e longo prazo (5 e 7 dias); verificar a liberação de citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α e analisar a síntese de óxido nítrico estimulados ou não com LPS, nos tempos de 24 e 48 horas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste projeto foram utilizados 70 camundongos (*Mus domesticus*) da linhagem C57Bl/6j (*isogênica*), fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade, em média com 22 a 25g de massa corporal. Os animais foram provenientes de colônias do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e mantidos em gaioleiros sob regime *ad libitum* de água e ração comercial (Nuvital[®]) até o início do experimento.

Todos os procedimentos realizados com os camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FCF/194 – Anexo A).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- **Grupo Controle** – somente meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado (SIGMA[®], CHEMICAL COMPANY, USA), pH 7,4, estéril e apirogênico;

- **Grupo Hipoclorito de sódio a 1% – dividido em dois subgrupos:**
 - Diluição A: 0,001%;
 - Diluição B: 0,0001%.

- **Grupo Digluconato de Clorexidina a 2% – dividido em dois subgrupos:**
 - Diluição A: 0,002%;
 - Diluição B: 0,0002%.

- **Grupo Detergente derivado do óleo de Mamona (Endoquil a 10%) – dividido em dois subgrupos:**
 - Diluição A: 0,01%;
 - Diluição B: 0,001%.

4.2.1 Preparo das soluções

As soluções estoque hipoclorito de sódio a 1% e solução de clorexidina a 2% foram formuladas comercialmente (Farmácia Fórmula & Ação) e o detergente derivado do óleo de mamona a 10% (Endoquil) foi obtido diretamente do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Todas as substâncias foram submetidas à filtração em filtros *millipore* 0,22 µm em ambiente estéril (capela de fluxo laminar), colocadas em frascos autoclavados, ao abrigo da luz e mantidas sob refrigeração até sua utilização.

Após a realização de teste piloto, observou-se que as soluções deveriam sofrer diluição prévia evitando a morte celular imediata. Para tanto, optou-se por

duas diluições, 1.000 vezes e 10.000 vezes para todos os grupos experimentais. Sendo assim, a partir de cada solução “original” obtiveram-se duas concentrações (A e B).

4.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

4.3.1 Coleta de macrófagos peritoniais residentes

Os animais foram previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg de peso corporal) e cetamina (120 mg/kg de peso corporal), exsanguinados por venossecção, sacrificados por deslocamento cervical e levados em potes contendo álcool iodado imediatamente para Capela de Fluxo Laminar dando prosseguimento à coleta celular.

Os animais foram imobilizados em placas de parafina na posição de decúbito dorsal para administração intraperitoneal de 5 mL de meio McCoy's 5A[®] modificado (SIGMA[®], CHEMICAL COMPANY, USA), pH 7,4, estéril e apirogênico com seringa de 5mL e agulha 25 x 7 mm estéreis e descartáveis. Em seguida, realizou-se delicada massagem da região abdominal (100 vezes) para obtenção dos macrófagos residentes. Após a incisão e divulsão da pele do animal a suspensão celular formada foi aspirada com a mesma seringa e agulha.

O conteúdo da seringa foi transferido para tubos tipo Falcon estéreis e apirogênicos de 15 mL e levados à centrifugação numa temperatura de 4°C, 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular ressuspenso em 1 mL de meio McCoy's 5A[®] modificado (SIGMA[®], CHEMICAL

COMPANY, USA), pH 7,4, estéril e apirogênico. Todo o procedimento de coleta e processamento das amostras foi realizado em condições assépticas (Figuras 4.1 e 4.2)

4.3.2 Viabilidade e número de células presentes no lavado peritoneal

A viabilidade de células presentes no lavado peritoneal foi avaliada por meio do teste de exclusão do azul de tripano 0,1%. Alíquota de 20 μ L da suspensão de 1mL obtida anteriormente foi adicionada a 380 μ L de azul de tripano para contagem em câmara de Neubauer (Figura 4.3).



Figura 4.1 - Anestesia, administração do meio de cultura e massagem abdominal



Figura 4.2 - Aspiração, transferência e centrifugação da suspensão celular

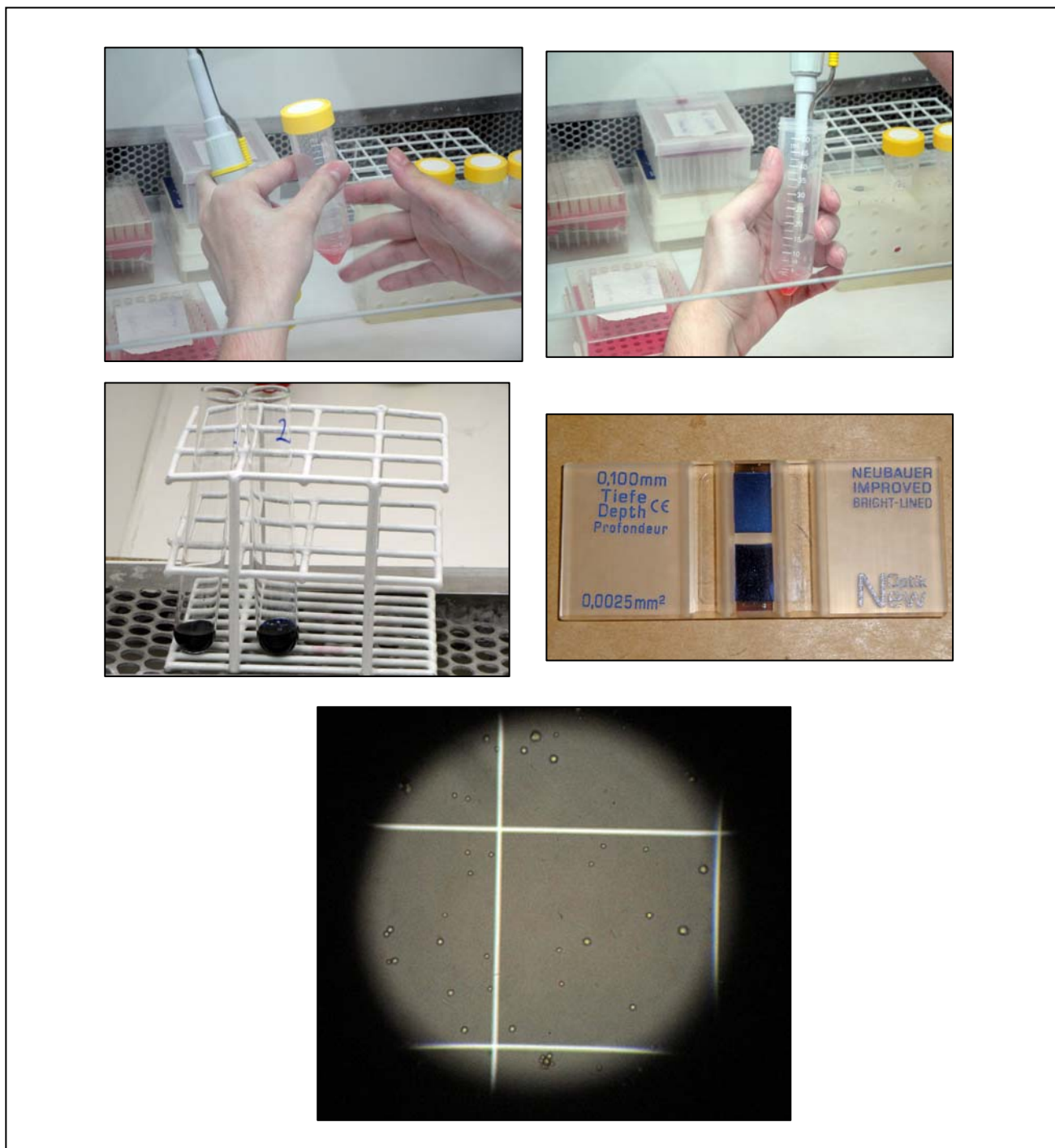


Figura 4.3 - Contagem celular – azul de tripano 0,1%

4.3.3 Plaqueamento celular

4.3.3.1 Plaqueamento celular para o ensaio do MTT

As suspensões celulares coletadas de acordo com o item 4.3.1 foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços numa concentração de 5×10^5 células e completadas com meio específico para cada grupo experimental (hipoclorito, clorexidina ou mamona) perfazendo um total de 150 μL por poço. O controle recebeu a mesma quantidade celular acrescida de meio (Figura 4.5)

Utilizou-se uma placa de cultura para cada tempo de observação na qual foram plaqueadas amostras, pelo menos em triplicata, para as soluções testadas, possibilitando a avaliação da citotoxicidade dos agentes. O plaqueamento das amostras foi realizado em condições assépticas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C , em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 pelos seguintes tempos:

- CURTO PRAZO: 4 e 12 horas;
- MÉDIO PRAZO: 24, 48 e 72 horas;
- LONGO PRAZO: 5 e 7 dias.

A distribuição dos grupos experimentais e dos respectivos controles na placa de cultura foi a seguinte (Figura 4.4) :

- I Branco – poços contendo apenas o meio de cultura;
- II Controle de absorbância das soluções – poços contendo meio de cultura adicionado às soluções experimentais nas concentrações A e B.
- III Controle positivo – poços contendo as células e o meio de cultura;
- IV Amostras – poços contendo células em meio de cultura e as soluções experimentais;

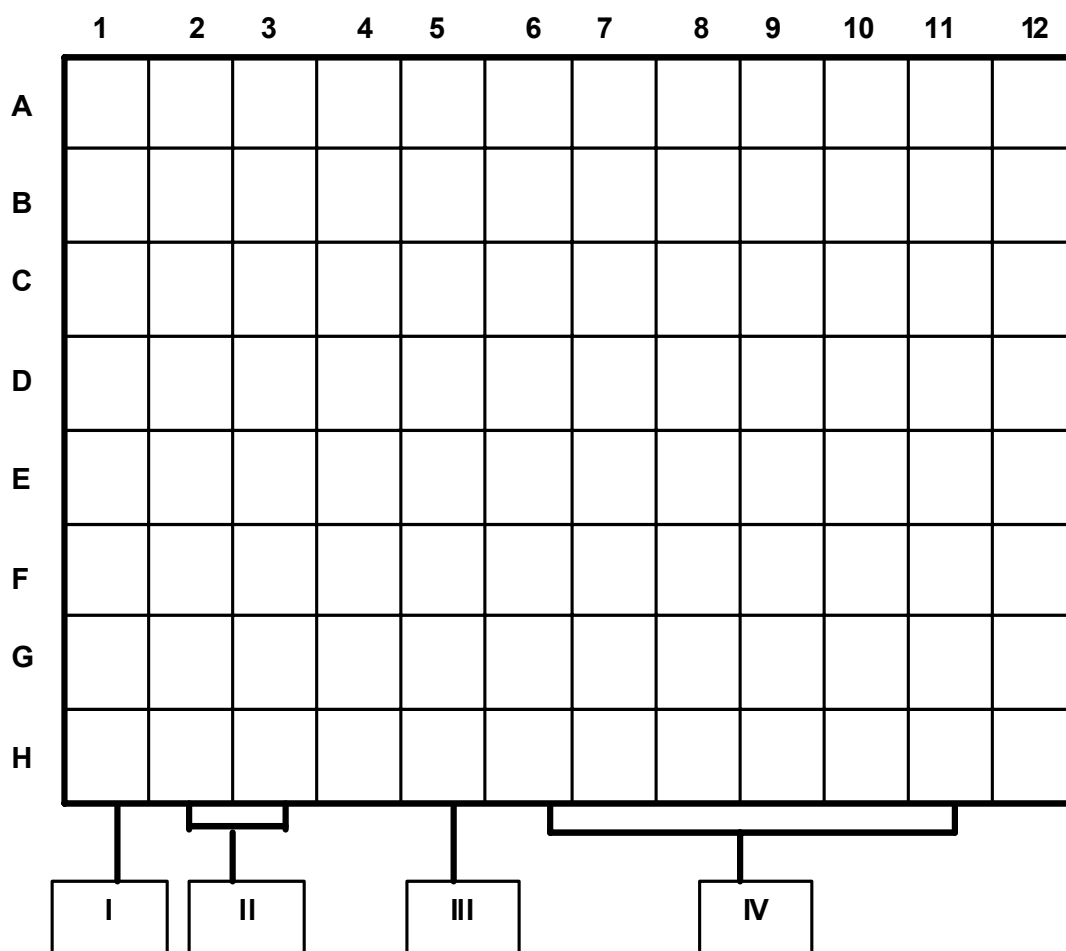


Figura 4.4 - Distribuição na placa de cultura de 96 poços – MTT

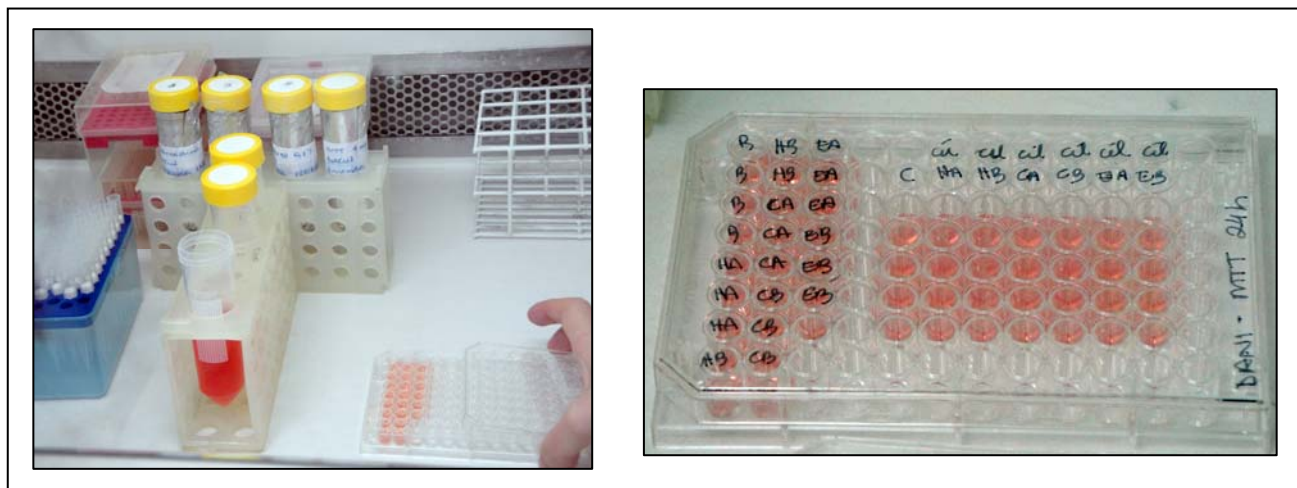


Figura 4.5 - Plaqueamento celular – MTT

4.3.3.2 Plaqueamento celular para o ensaio de produção de citocinas e óxido nítrico

Células obtidas de acordo com o descrito no item 4.3.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 /mL em placas de cultura de 24 poços e incubadas durante 1 hora, a 37°C , 5% CO_2 , em atmosfera úmida. Após este tempo, os poços foram lavados com meio de cultura a fim de se remover as células não aderentes e enriquecer a cultura com macrófagos peritoniais. As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de $1,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (O55:B5) (SIGMA-ALDRICH) durante 24 e 48 horas, a 37°C , 5% CO_2 , em atmosfera úmida. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a determinação da concentração de óxido nítrico e de citocinas (Figura 4.7).

A distribuição dos grupos experimentais e dos respectivos controles na placa de cultura foi a seguinte (Figura 4.6) :

B – BRANCO – meio de cultura

C – COTROLE - células

A – AMOSTRAS – grupos experimentais

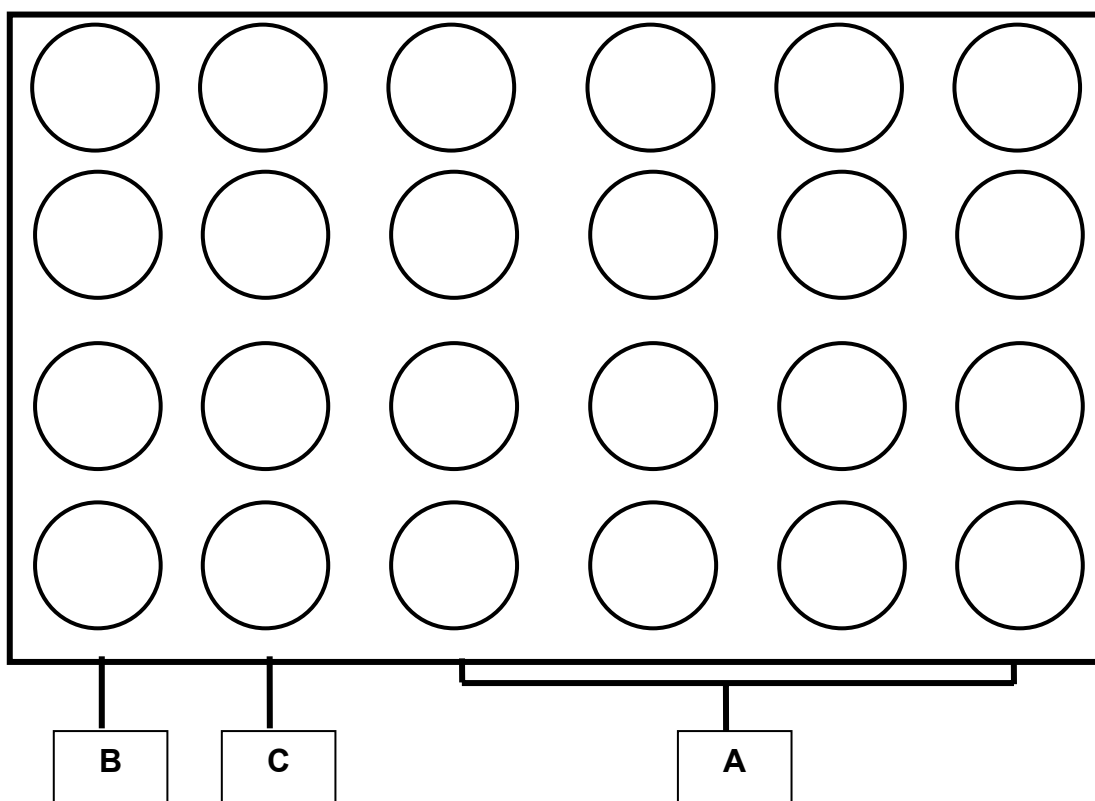


Figura 4.6 - Distribuição da placa de cultura de 24 poços – citocinas e NO

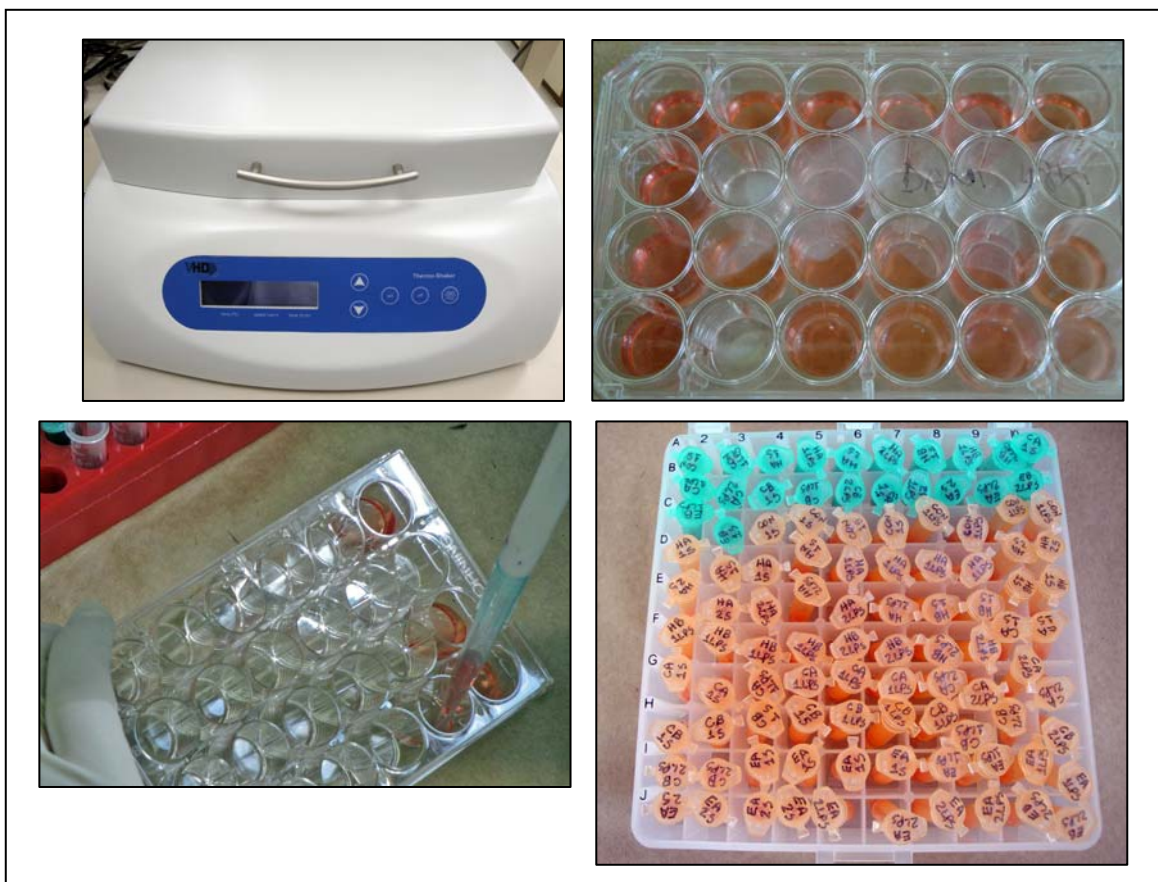


Figura 4.7 - Plaqueamento, incubação, lavagem e congelamento

4.4 CITOTOXICIDADE

O ensaio da atividade citotóxica das soluções experimentais foi realizado pelo Método do MTT. As desidrogenases mitocondriais são capazes de transformar o anel de tetrazólio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (amarelo) em uma formazana intensamente colorida (azul), insolúvel, que absorve intensamente a 550 nm. Como estas enzimas só estão ativas em células vivas, a absorbância lida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Após incubação de acordo com os tempos descritos no item 4.3.3.1, adicionou-se 10 μL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço e as placas retornaram novamente para estufa a 37°C, com atmosfera controlada de 5% de CO_2 , durante 2h, para a formação dos cristais azuis insolúveis. Em seguida, adicionou-se 100 μL de solução solvente SDS (dodecil sulfato de sódio a 20% em uma solução de HCl a 0,01M) a cada poço e novamente incubou-se em estufa a 37°C, com atmosfera controlada de 5% de CO_2 , por pelo menos 12 horas (overnight), para que os cristais formados fossem solubilizados. Em todas as etapas tomou-se o cuidado de proteger as placas da luz. A absorbância dos poços foi lida em Leitora de Elisa a 550 nm.

Realizou-se uma curva-padrão por meio das diluições celulares (10^3 , 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 células), medindo a absorbância relativa a cada concentração de células. (Figura 4.8)

Os valores obtidos foram correlacionados com a respectiva concentração de células por meio de equação logarítmica, determinando-se a reta média do padrão.

Os dados correspondentes aos ensaios de curto, médio e longo prazo foram comparados aos valores do padrão, calculando-se assim a viabilidade e o número de células presentes de cada grupo avaliado em função do tempo.

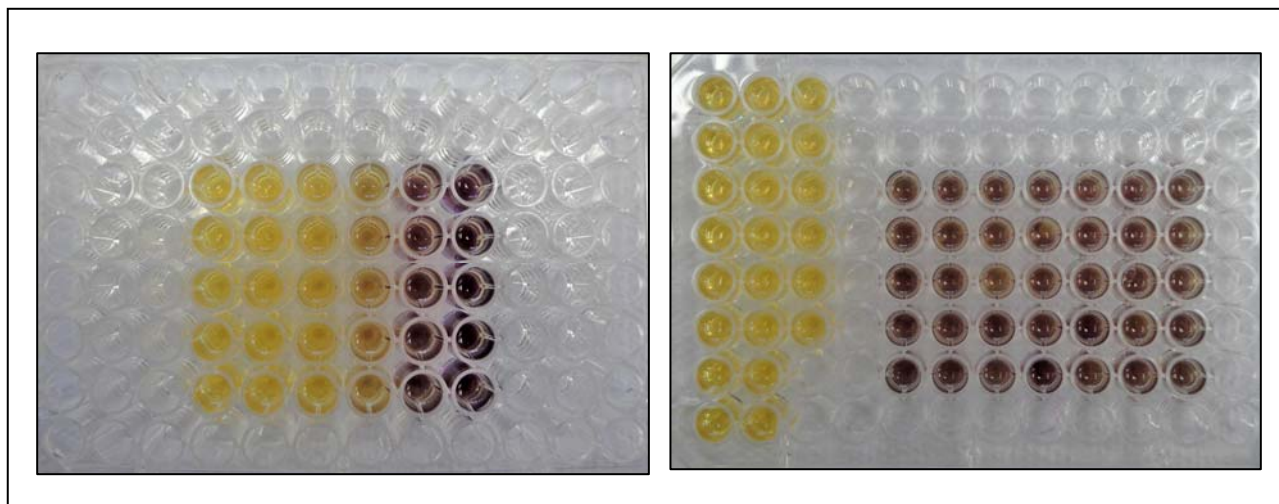


Figura 4.8 - Curva-padrão e plaqueamento celular - MTT

4.5 SÍNTESE DE CITOCINAS

Todo o plaqueamento, para cada uma das citocinas, foi realizado em duplicata para avaliação da produção em 24 e 48 horas (como descrito no item 4.3.3.2).

A quantificação, *in vitro*, das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi realizada com os sobrenadantes previamente coletados (item 4.3.1), armazenados em tubos Eppendorf de 2 ml estéreis, devidamente identificados, e mantidos a -80°C até análise.

Todas as determinações das citocinas foram realizadas por meio de imunoenensaio do tipo Elisa, utilizando-se *kit* Quantikine[®] Murine (R&D Systems, USA), seguindo a metodologia indicada pelo fabricante.

Alíquotas de 50 μ L do conteúdo de cada tubo Eppendorf foram distribuídas nas placas de 96 poços de acordo com cada grupo experimental, nas duas concentrações dos agentes (A e B), nos dois tempos de observação, com

estímulo de LPS ou não, em duplicatas. Para cada uma das citocinas, foi utilizada uma placa para o tempo de 24 horas e outra para o tempo de 48 horas, obtendo-se um total de 72 poços: 8 poços preenchidos pelas soluções-padrão; 4 poços para o controle; 1 poço para o controle do kit; 24 poços para as amostras e 1 poço com o branco.

As placas de 96 poços continham anticorpos específicos, aderidos ao fundo dos poços, para cada citocina estudada: anti-IL-1 α , anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-TNF- α . Após a adição de 50 μ L dos sobrenadantes, as placas foram gentilmente agitadas por 1 minuto e mantidas em incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sem agitação. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e lavado 5 vezes com o tampão de lavagem fornecido pelo kit.

Alíquotas de 100 μ L de anticorpos biotinizados conjugados à peroxidase específicos para cada citocina analisada foram adicionadas aos poços e as placas retornaram para incubação por mais 2 horas à temperatura ambiente, sem agitação. Ao final deste período as placas sofreram outros 5 ciclos de aspiração e lavagem.

Após este período, 100 μ L de solução de substrato (fornecida pelo kit) foram adicionados a cada poço. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente sem agitação, foi realizada a medida da absorbância dos poços em leitora de ELISA a 450 nm.

As soluções-padrão foram obtidas a partir da reconstituição da solução estoque liofilizada com o diluente calibrador, ambos fornecidos pelos kits, e posteriormente submetidas a diluições seriadas específicas para cada citocina: IL-1 α e TNF- α (300; 150; 75; 37,5; 18,7; 9,38; 4,69; 0 pg/mL); IL-1 β e IL-6 (500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 0 pg/mL) fornecendo assim uma curva de diluição

utilizada como curva-padrão. Os valores obtidos para a concentração das citocinas foram expressos em pg/mL.

4.6 SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

A análise da síntese de óxido nítrico foi conduzida em amostras do sobrenadante de cultura de células peritoniais obtido após 24 e 48 horas de cultivo conforme itens 4.3.1 e 4.3.3.2. A determinação foi realizada em placa de 96 poços segundo a metodologia de Griess (1879), na qual o óxido nítrico é convertido a nitrito, sendo esta última a espécie detectada colorimetricamente.

A distribuição dos compostos nas placas obedeceu a seguinte orientação (Figura 4.9):

- 1ª coluna – Branco (100 µL de meio + 100 µL do Reagente de Griess);
- 2 e 3ª colunas – Padrões (10 µL do padrão + 90 µL de meio + 100 µL do Reagente de Griess);
- Demais poços – Amostras (100 µL das amostras + 100 µL do Reagente de Griess).

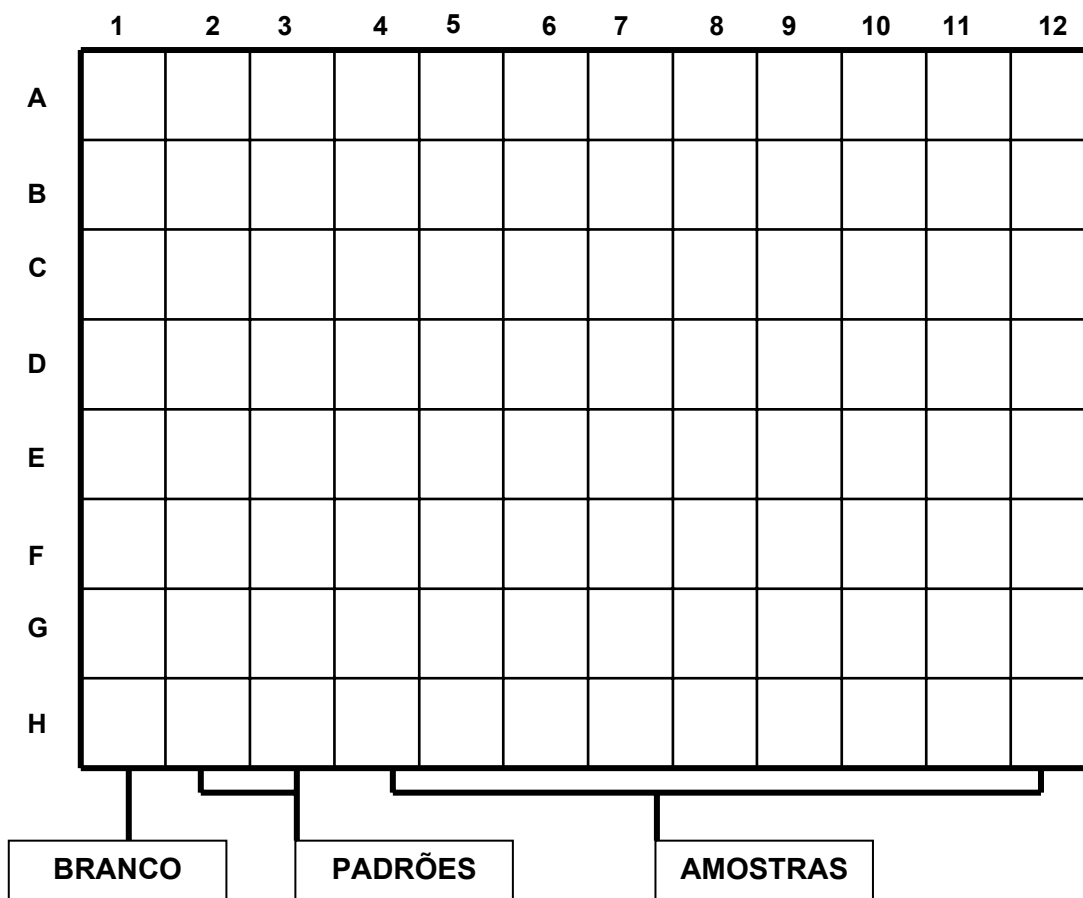


Figura 4.9 - Distribuição na placa de cultura de 96 poços - NO

Para a obtenção da curva-padrão uma solução-estoque de NaNO_2 (10mM) passou por uma diluição seriada a fim de se obter as concentrações : $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $40\mu\text{M}$ e $80\mu\text{M}$. Os valores obtidos para a concentração das citocinas foram expressos em μM (Figura 4.10).

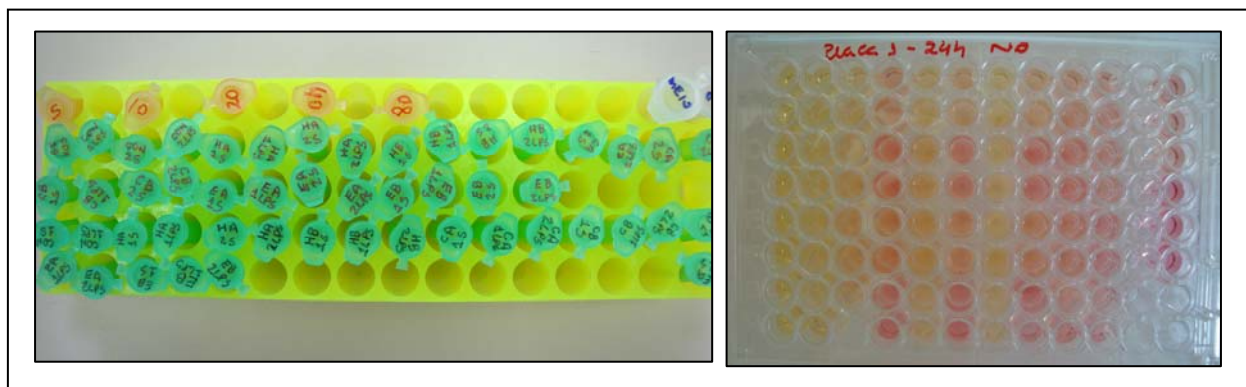


Figura 4.10 - Amostras congeladas e plaqueamento celular – NO

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores apresentados foram ordenados e tabulados, e assim, obtidas as médias e desvios-padrão em função dos grupos e tempos experimentais. Os dados submetidos ao teste estatístico de análise de variância a quatro critérios (Substância, Diluições, Tempos e presença de LPS) e, quando necessário, complementados pelo teste de Tukey.

As diferenças estatísticas foram consideradas significantes ao nível de 0,5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

MTT

Os valores médios de MTT (n^ocel/mL) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos nas tabelas 5.1 (diluição A) e 5.2 (diluição B).

Tabela 5.1 – Média e desvio padrão das concentrações de MTT (n^ocel/mL) em todos os grupos estudados, na diluição A

Dil.	Tempo	NAOCL		CLX		Endoquil		Controle	
		média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
	4h	402.875	21.805	446.875	108.035	461.125	16.933	454.125	39.416
	12h	381.125	11.759	198.625	124.709	338.125	30.690	305.125	88.699
	24h	529.000	68.722	137.000	94.333	561.500	11.818	520.500	86.554
A	48h	405.000	88.068	8.333	15.011	428.333	19.732	423.667	20.817
	72h	155.000	17.436	-10.333	3.055	262.333	13.317	224.333	31.005
	5d	217.625	22.697	-61.375	4.419	220.875	11.264	230.875	12.544
	7d	162.125	26.801	-53.625	8.072	157.375	14.631	172.625	18.316

Tabela 5.2 – Média e desvio padrão das concentrações de MTT (n°cel/mL) em todos os grupos estudados, na diluição B

Dil. Tempo	NAOCL		CLX		Endoquil		Controle	
	média	dp	média	dp	média	Dp	média	dp
4h	391.875	90.124	450.125	77.487	428.625	42.436	454.125	39.416
12h	392.375	28.408	361.125	13.607	397.375	27.071	454.125	39.416
24h	616.500	62.788	542.500	70.529	615.500	83.465	520.500	86.554
B 48h	419.667	13.614	315.667	125.369	413.667	19.218	423.667	20.817
72h	193.000	38.314	109.667	107.598	304.333	22.480	224.333	31.005
5d	213.625	15.436	-26.375	18.371	217.875	12.330	230.875	12.544
7d	161.375	18.443	-143.625	5.755	143.875	12.228	172.625	18.316

Conforme as tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e os gráficos 5.1 e 5.2, nas primeiras 4 horas todos os grupos nas duas concentrações se comportaram de maneira semelhante. No entanto, após 12 horas, o grupo tratado com clorexidina na diluição A apresentou diminuição significativa da viabilidade celular em relação aos grupos tratados com hipoclorito de sódio e Endoquil.

Tabela 5.3 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (n°cel/mL) em 4h e 12h

Grupos	4h	12h
Endoquil x Controle	ns	ns
CLX x Controle	ns	ns
NaOCL x Controle	ns	ns
Endoquil x CLX	ns	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns	ns
NaOCL x CLX	ns	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.4 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (n°cel/mL) em 4h e 12h

Grupos	4h	12
Endoquil x Controle	ns	ns
CLX x Controle	ns	ns
NaOCL x Controle	ns	ns
Endoquil x CLX	ns	ns
Endoquil x NaOCL	ns	ns
NaOCL x CLX	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Segundo as tabelas 5.1, 5.2, 5.5 e 5.6 e os gráficos 5.3, 5.4 e 5.5, em 24 horas a viabilidade do grupo tratado com clorexidina na diluição A diminui ainda mais, continuando significativamente inferior à apresentada pelos grupos tratados com hipoclorito e Endoquil. A partir de 48 horas, o grupo tratado com clorexidina na concentração B apresentou redução da viabilidade em relação aos demais grupos, porém de forma não significativa. O grupo tratado com clorexidina na concentração A continuou apresentando viabilidade significativamente redução em relação aos demais grupos. Esta tendência se estende para 72 horas quando, na maior concentração, a clorexidina provoca morte celular (concentrações negativas). Neste período, apesar de não haver diferenças significantes, o grupo tratado com hipoclorito de sódio nas concentrações A e B apresenta redução da viabilidade celular.

Tabela 5.5 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (n°cel/mL) em 24h, 48h e 72h

Grupos	24h	48h	72h
Endoquil x Controle	ns	ns	ns
CLX x Controle	<0,05*	<0,05*	<0,05*
NaOCL x Controle	ns	ns	ns
Endoquil x CLX	<0,05*	<0,05*	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns	ns	ns
NaOCL x CLX	<0,05*	<0,05*	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.6 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (n°cel/mL) em 24h, 48h e 72h

Grupos	24h	48	72
Endoquil x Controle	ns	ns	ns
CLX x Controle	ns	ns	ns
NaOCL x Controle	ns	ns	ns
Endoquil x CLX	ns	ns	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns	ns	ns
NaOCL x CLX	ns	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Em 5 e 7 dias, conforme tabelas 5.1, 5.2, 5.7 e 5.8 e gráficos 5.6 e 5.7 a redução da viabilidade apresentada pelos grupos tratados com hipoclorito, clorexidina e Endoquil nas duas concentrações é semelhante à apresentada pelo grupo controle. A viabilidade dos grupos tratados com clorexidina nas duas concentrações permanece significativamente inferior à apresentada pelos demais grupos.

Tabela 5.7 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição A no MTT (n°cel/mL) em 5 e 7 dias

Grupos	5d	7d
Endoquil x Controle	ns	ns
CLX x Controle	<0,05*	<0,05*
NaOCL x Controle	ns	ns
Endoquil x CLX	<0,05*	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns	ns
NaOCL x CLX	<0,05*	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.8 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias na diluição B no MTT (n°cel/mL) em 5 e 7 dias

Grupos	5d	7d
Endoquil x Controle	ns	ns
CLX x Controle	<0,05*	<0,05*
NaOCL x Controle	ns	ns
Endoquil x CLX	<0,05*	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns	ns
NaOCL x CLX	<0,05*	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

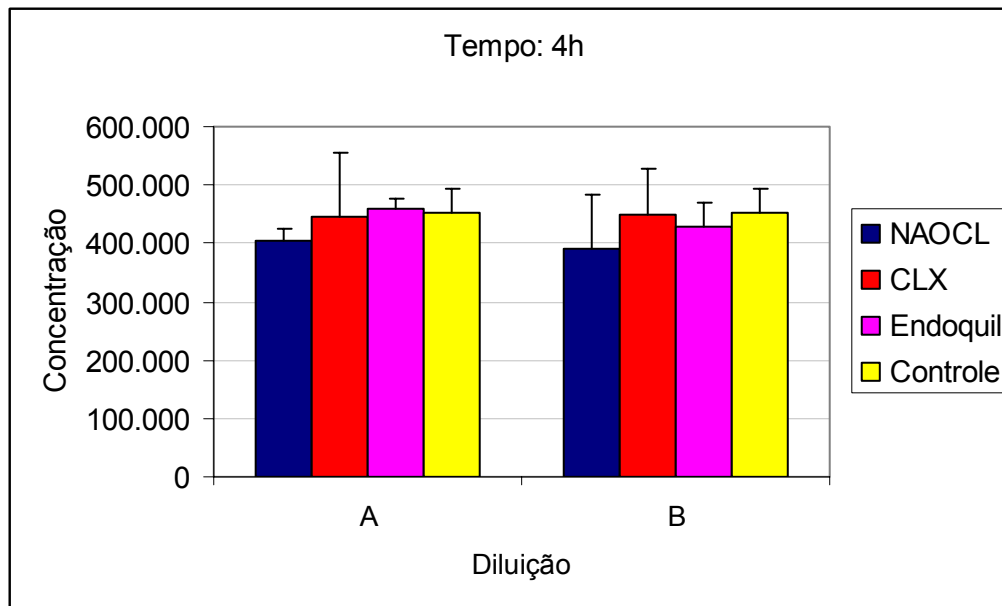


Gráfico 5.1 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 4h

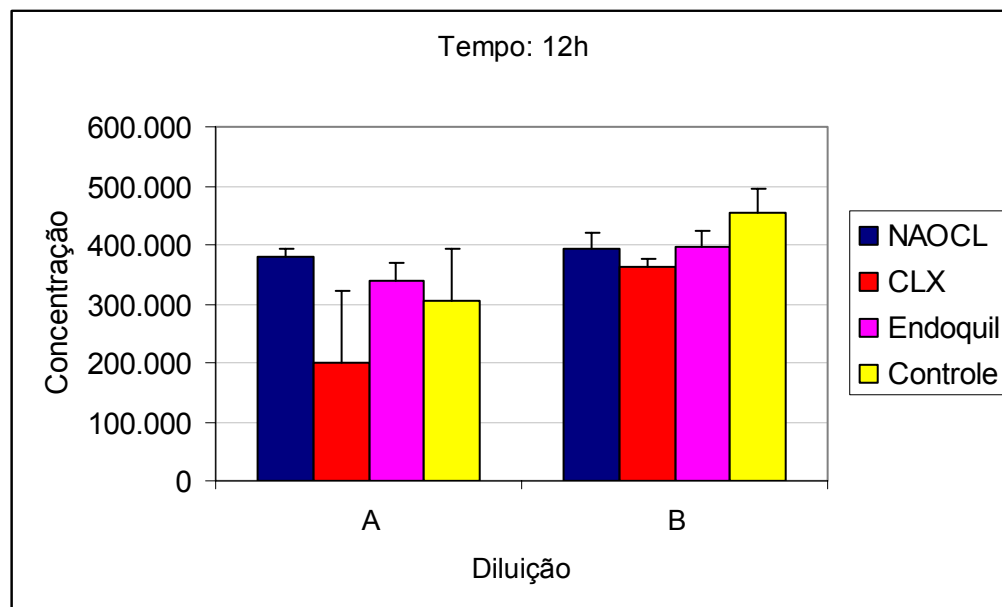


Gráfico 5.2 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 12h

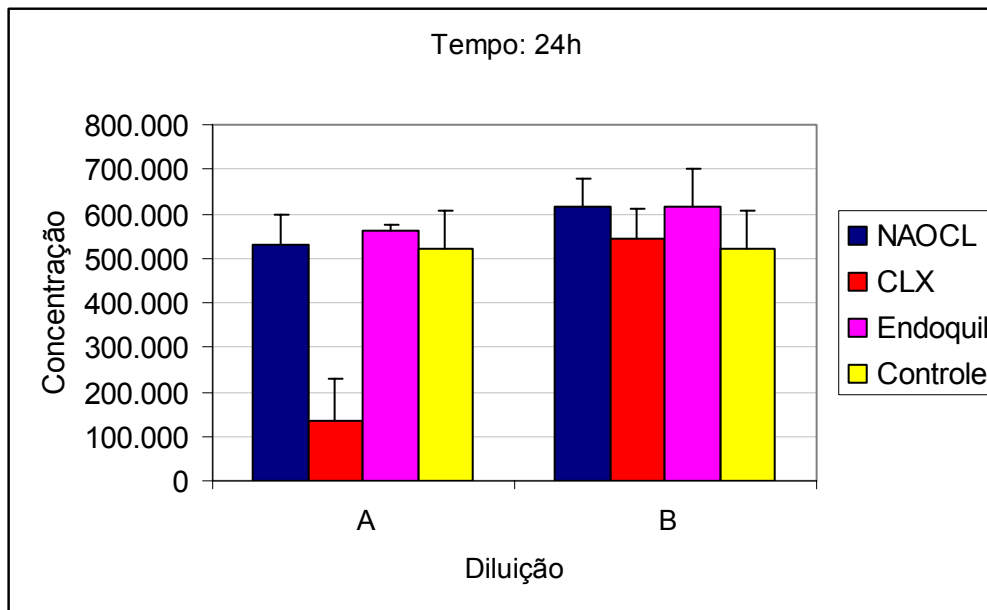


Gráfico 5.3 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 24h

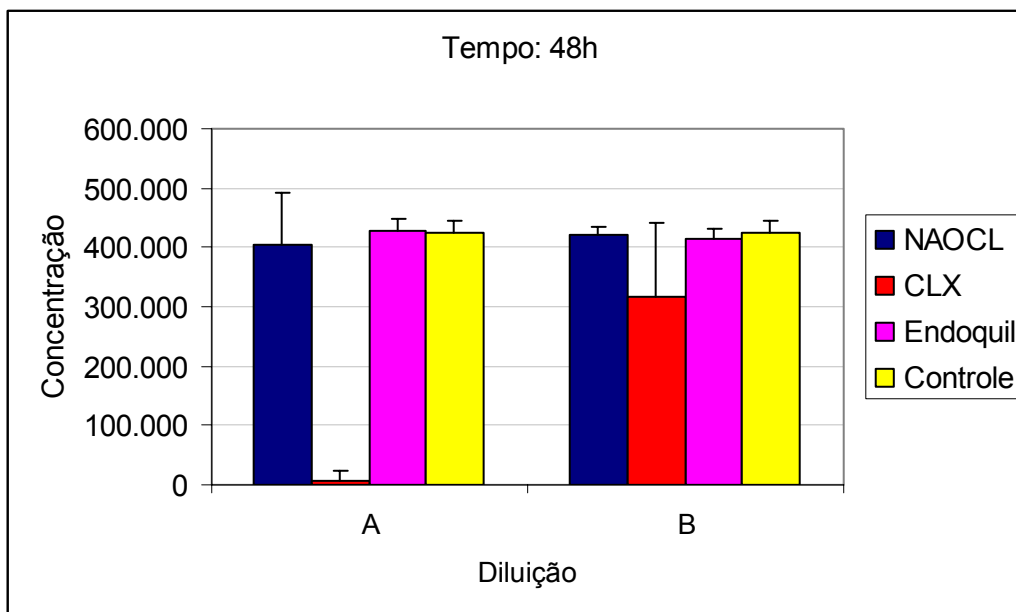


Gráfico 5.4 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 48h

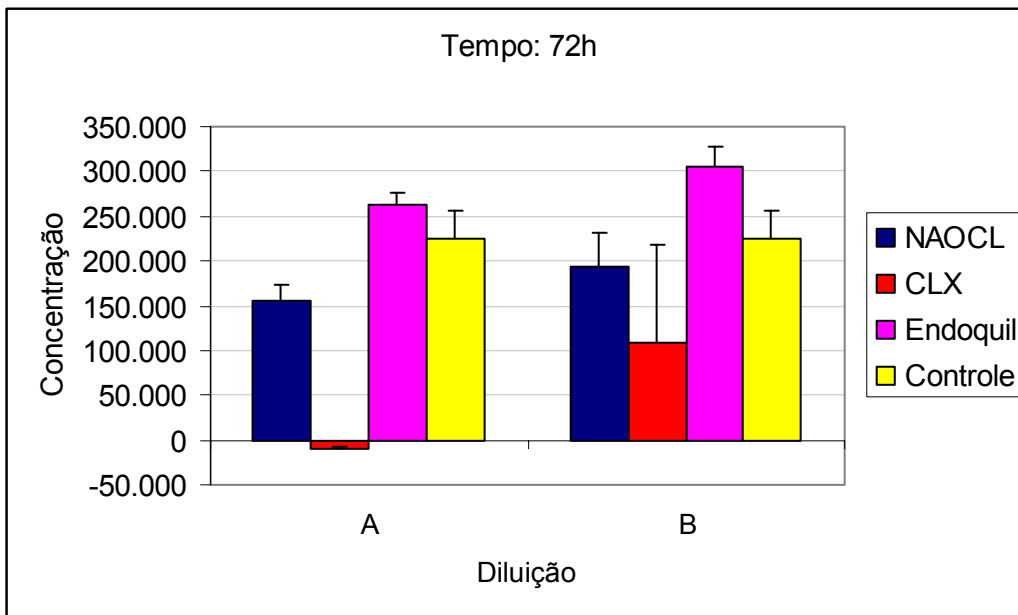


Gráfico 5.5 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 72h

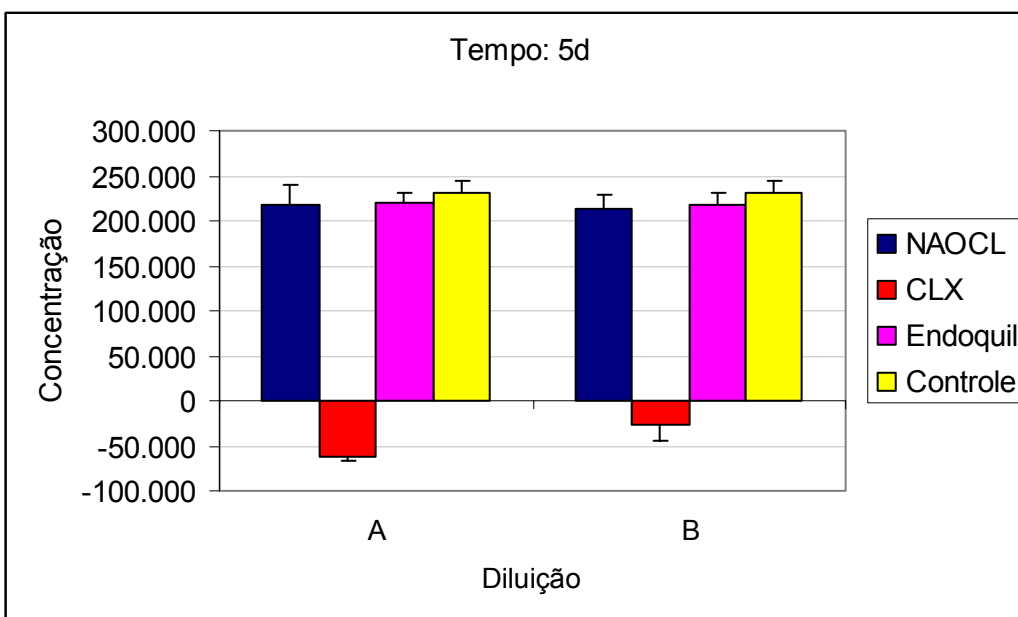


Gráfico 5.6 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 5 dias

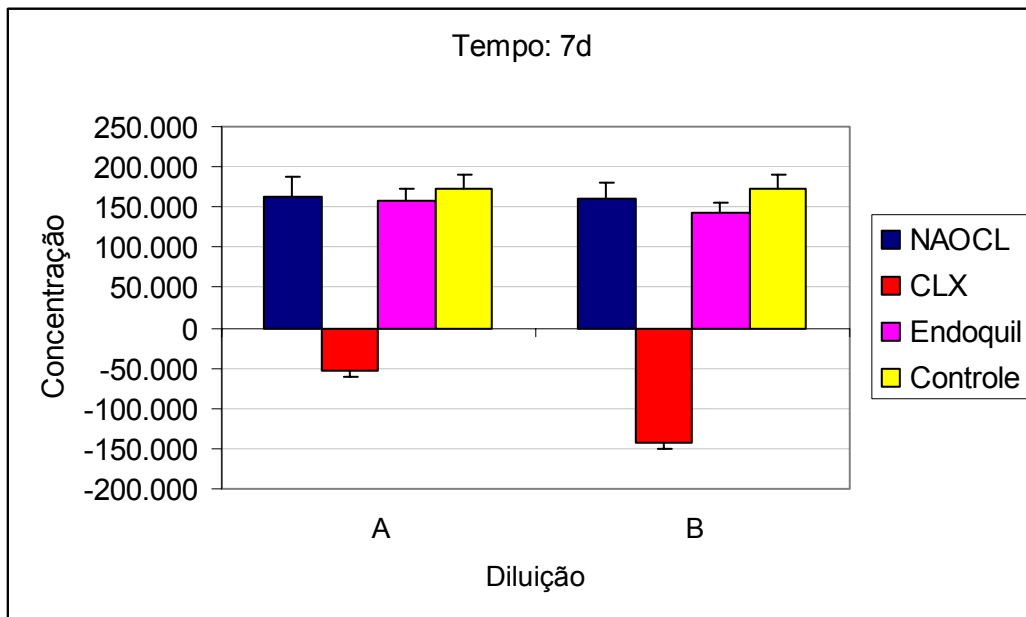


Gráfico 5.7 – concentrações (média e dp) de MTT (n°cel/mL) em 7 dias

IL – 1 α

Os valores médios de IL-1 α (pg/ml) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos na tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-1 α (pg/ml) em todos os grupos estudados

Dil.	Tempo	LPS	NaOCL		CLX		Endoquil		Controle	
			média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
A	24h	Com	363,55	2,46	362,39	0,61	214,42	8,20	257,75	10,66
		Sem	359,06	3,48	360,51	2,87	166,38	27,16	164,57	4,51
	48h	Com	361,38	2,05	360,87	5,02	272,75	17,52	281,16	51,14
		Sem	364,20	1,13	368,55	9,94	160,22	20,91	250,58	55,65
B	24h	Com	315,80	8,30	326,67	18,14	191,01	40,48	257,75	10,66
		Sem	213,48	33,51	219,64	21,32	180,43	62,20	164,57	4,51
	48h	Com	297,39	1,54	368,41	0,10	229,93	18,86	281,16	51,14
		Sem	291,52	4,30	358,26	4,41	143,55	2,87	250,58	55,65

24 HORAS

De acordo com a tabela 5.10 e o gráfico 5.8, verificou-se que o hipoclorito e a clorexidina, na diluição A, estimularam a produção de IL-1 α no estado basal (sem LPS). O efeito pró-inflamatório do LPS nos grupos Controle e tratado com Endoquil foi mantido uma vez que estes apresentaram aumento da produção desta citocina após estímulo com LPS. No entanto, este aumento foi inferior ao apresentado pelos demais grupos. Já os grupos tratados com hipoclorito e

clorexidina, quando estimulados, continuaram apresentando alta produção de IL1 α assim como na condição não estimulada, sugerindo que esses dois agentes, na menor diluição, levariam a produção máxima dessa citocina.

Com a redução das concentrações das soluções irrigadoras (diluição B), resultados expressos na tabela 5.9 e 5.11 e gráfico 5.9, verificou-se que as mesmas, na ausência de LPS, não foram capazes de promover o estímulo da citocina IL-1 α , demonstrando um efeito dependente da concentração. No entanto, a concentração de Endoquil utilizada promoveu a redução do efeito pró-inflamatório do LPS, enquanto que as outras substâncias levaram à sua exacerbação.

Tabela 5.10 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição A

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	<0,05*	ns
NaOCL A x Controle	<0,05*	ns
Endoquil A x CLX A	<0,05*	<0,05*
Endoquil A x NaOCL A	<0,05*	<0,05*
NaOCL A x CLX A	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.11 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição B

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	ns	ns
CLX B x Controle	ns	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	ns	<0,05*
Endoquil B x NaOCL B	ns	<0,05*
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

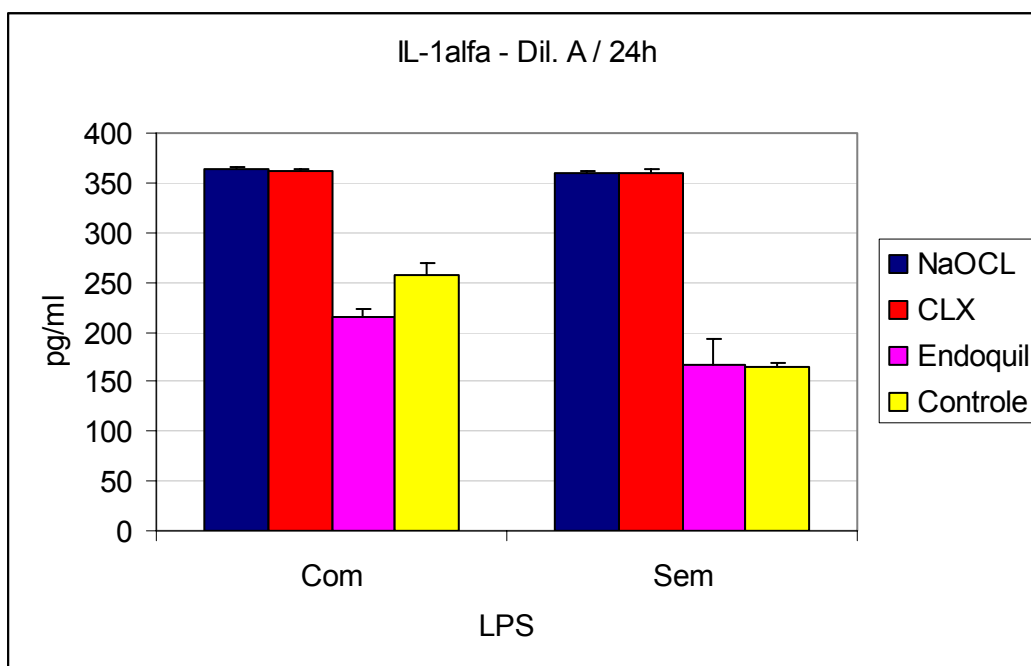


Gráfico 5.8 – concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição A (24h)

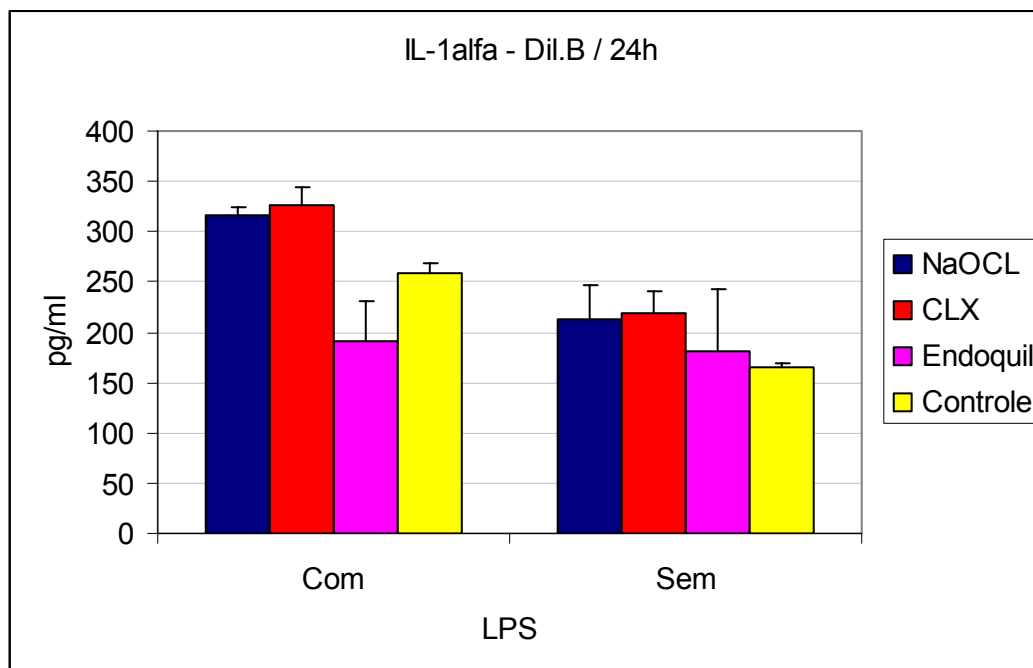


Gráfico 5.9 – concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição B (24h)

48 HORAS

Os resultados das tabelas 5.9 e 5.12 e do gráfico 5.10 evidenciaram que, na diluição A, as soluções irrigadoras mantiveram o comportamento encontrado em 24 horas. O grupo tratado com Endoquil, sem o estímulo de LPS apresentou redução da produção da citocina IL-1 α quando comparado com o grupo controle e com as demais substâncias. Os grupos tratados com Hipoclorito e Clorexidina apresentaram alta produção de IL1a, tanto no estado basal, quanto após estímulo com LPS. Houve um aumento da produção dessa citocina pelos grupos controle e tratado com Endoquil após estímulo com LPS, porém ainda inferior aos demais grupos.

Observando-se os resultados correspondentes à maior diluição (B) expressas nas tabelas 5.9 e 5.13 e no gráfico 5.11, as substâncias, no estado basal, aumentaram a produção de IL-1a em relação ao tempo de 24 horas, exceto o Endoquil. O grupo tratado com clorexidina não estimulado por LPS apresentou

aumento da produção de IL-1 α em relação ao controle e ao Endoquil. Quando estimulados pelo LPS, a produção dessa citocina pelos grupos tratados com hipoclorito e a clorexidina continuou alta. O grupo tratado com Endoquil, nesta situação apresentou aumento da produção de IL-1 α , porém permanecendo inferior à apresentada pelo grupo tratado com clorexidina.

Tabela 5.12 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição A

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	<0,05*	ns
NaOCL A x Controle	<0,05*	ns
Endoquil A x CLX A	<0,05*	ns
Endoquil A x NaOCL A	<0,05*	ns
NaOCL A x CLX A	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.13 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-1 α (pg/ml) na diluição B

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	<0,05*	ns
CLX B x Controle	<0,05*	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	<0,05*	<0,05*
Endoquil B x NaOCL B	<0,05*	ns
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

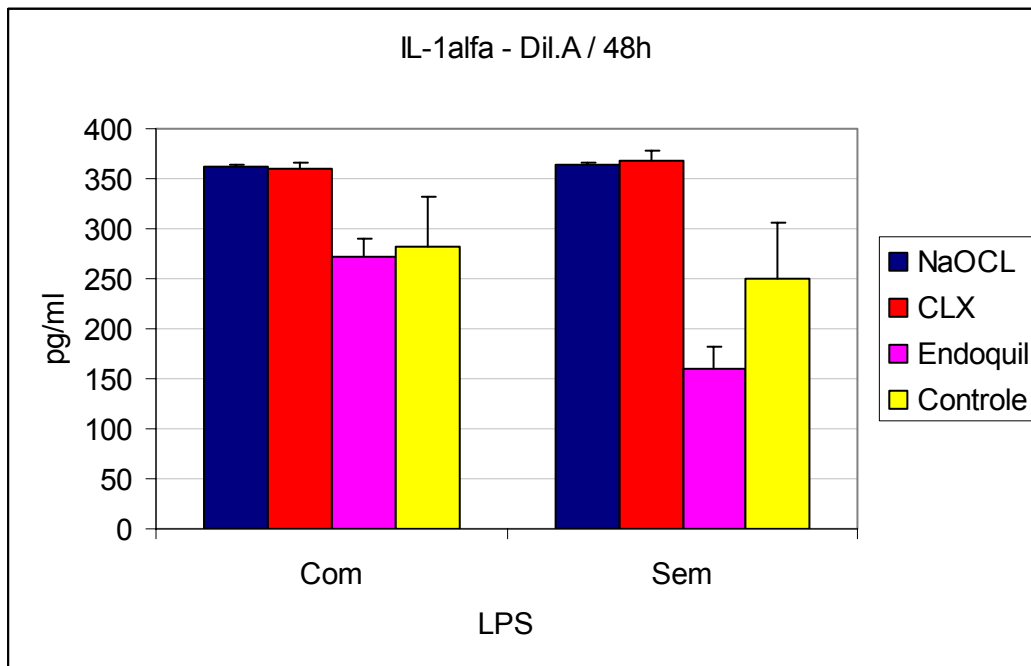


Gráfico 5.10 – concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição A (48h)

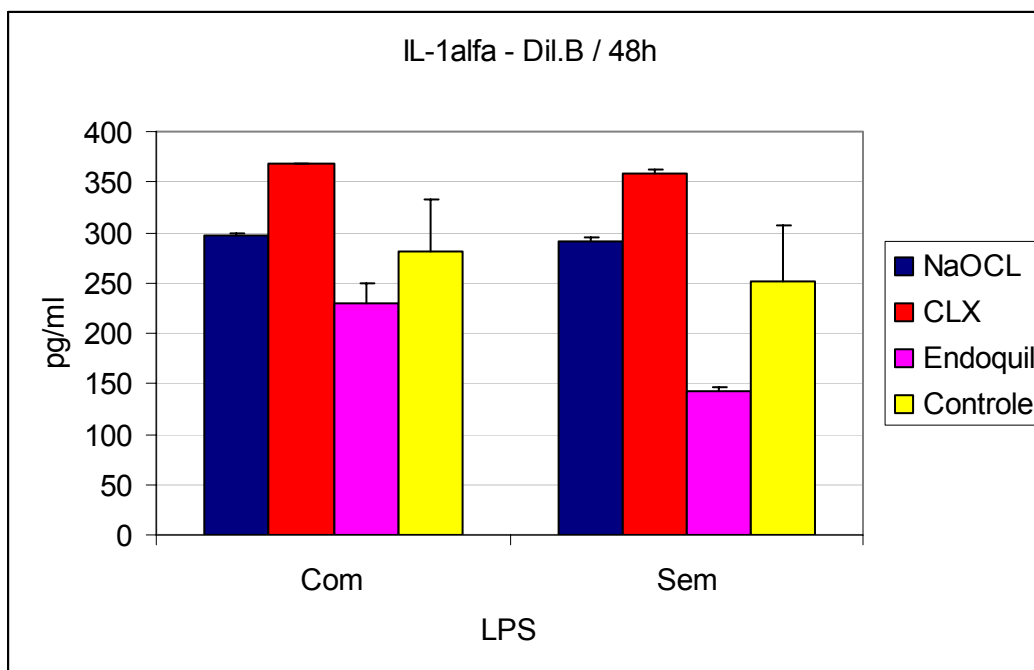


Gráfico 5.11 – concentrações (média e dp) de IL- 1 α (pg/ml) na diluição B (48h)

Quando analisados separadamente, o comportamento dos grupos controle e tratado com hipoclorito não foi alterado em virtude da adição do LPS, do aumento do tempo e da diminuição da concentração; o grupo tratado com clorexidina na diluição B sofreu influência do tempo, visto que, tanto na condição basal quanto após estímulo com LPS, apresentou aumento da síntese de IL-1a em relação aos demais grupos; em 48 horas o grupo tratado com Endoquil na diluição A apresentou aumento da produção dessa citocina após estímulo com LPS (Apêndice A).

IL – 1 β

Os valores médios de IL-1 β (pg/ml) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos na tabela 5.14. e nos gráficos 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

Tabela 5.14 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-1 β (pg/ml) em todos os grupos estudados

Dil.	Tempo	LPS	NaOCL		CLX		Endoquil		Controle	
			média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
A	24h	Com	183,35	52,90	229,28	42,69	89,19	4,58	124,09	18,33
		Sem	90,02	3,93	118,91	39,02	70,20	9,17	62,98	3,93
	48h	Com	98,07	5,37	109,28	31,95	86,59	1,44	114,47	45,84
		Sem	81,96	11,39	127,53	58,28	93,08	34,19	132,34	75,04
B	24h	Com	122,33	5,89	106,59	2,49	87,52	27,63	124,09	18,33
		Sem	56,04	13,75	43,17	2,36	77,89	23,18	62,98	3,93
	48h	Com	95,11	1,70	136,13	11,79	80,57	10,74	114,47	45,84
		Sem	104,10	39,56	83,64	41,78	88,08	43,88	132,34	75,04

Tabela 5.15 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator Substância para a IL-1 β (pg/ml)

Grupo	Média
Endoquil	84,14 a
NaOCL	103,87 a b
Controle	108,47 a b
CLX	119,31 b

Grupos com a mesma letra não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

Como não ocorreu interação entre o fator substância ele foi analisado separadamente, fazendo as comparações grupo a grupo (Tabelas 5.15 e 5.16). O comportamento dos grupos controle tratado com hipoclorito foi semelhante, sem diferenças estatísticas, para todas as concentrações, tempos, quando estimuladas ou não pelo LPS. Já os grupos tratados com clorexidina e Endoquil apresentaram diferenças significantes. Avaliando-se os grupos tratados com clorexidina e endoquil na diluição A e no tempo de 24 horas, observou-se uma tendência do primeiro de exacerbar o efeito do LPS, evidenciado pelo aumento da produção de IL-1 β , enquanto o segundo parece ter atenuado o efeito pró-inflamatório do LPS, evidenciado pela redução da produção dessa citocina em relação aos demais grupos. Não houve diferença na produção de IL-1 β entre os grupos experimentais no tempo de 48 horas. Avaliando-se a produção dessa citocina nos grupos tratados com os agentes irrigadores na diluição B, não foi verificada diferença entre os grupos experimentais nos tempos avaliados.

Tabela 5.16 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator Substância para a IL-1 β (pg/ml).

Grupos	Diferença
Endoquil x Controle	ns
CLX x Controle	ns
NaOCL x Controle	ns
Endoquil x CLX	<0,05*
Endoquil x NaOCL	ns
NaOCL x CLX	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

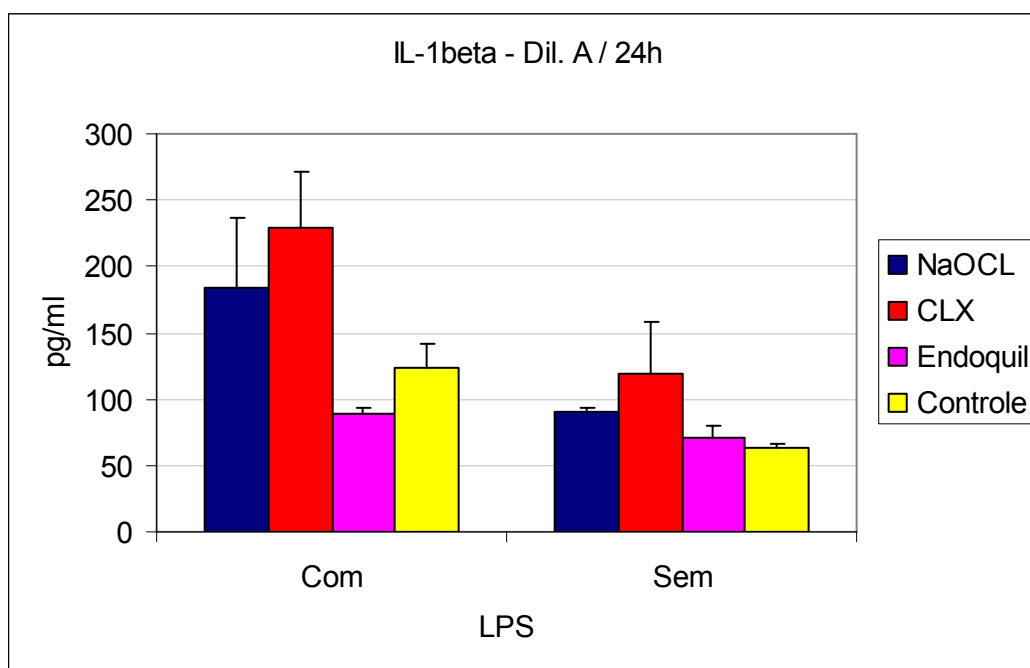


Gráfico 5.12 – concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição A (24h)

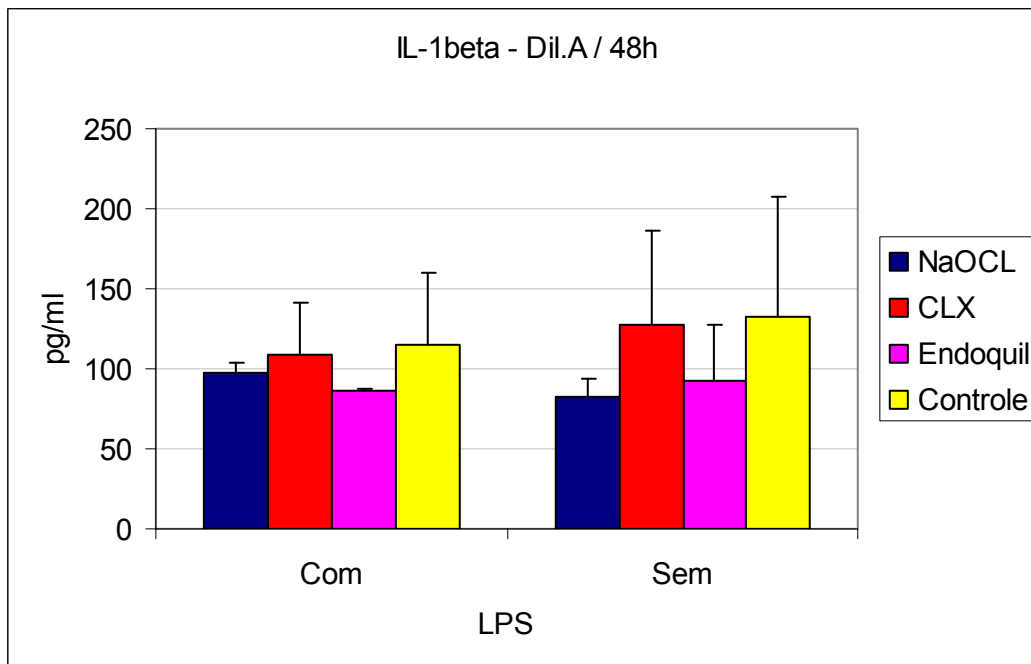


Gráfico 5.13 – concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição A (48h)

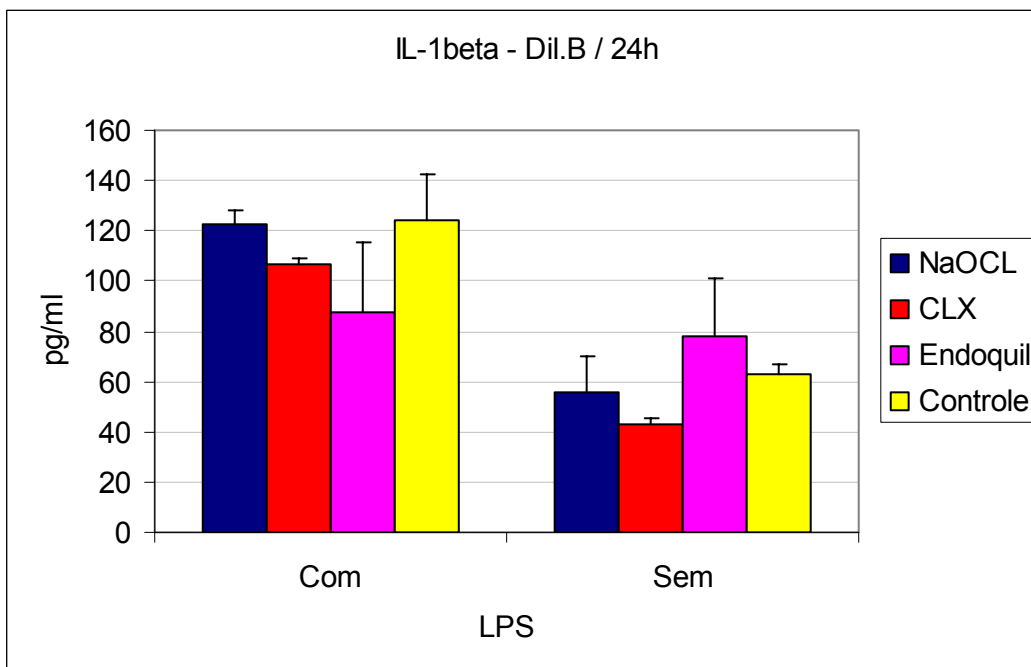


Gráfico 5.14 – concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição B (24h)

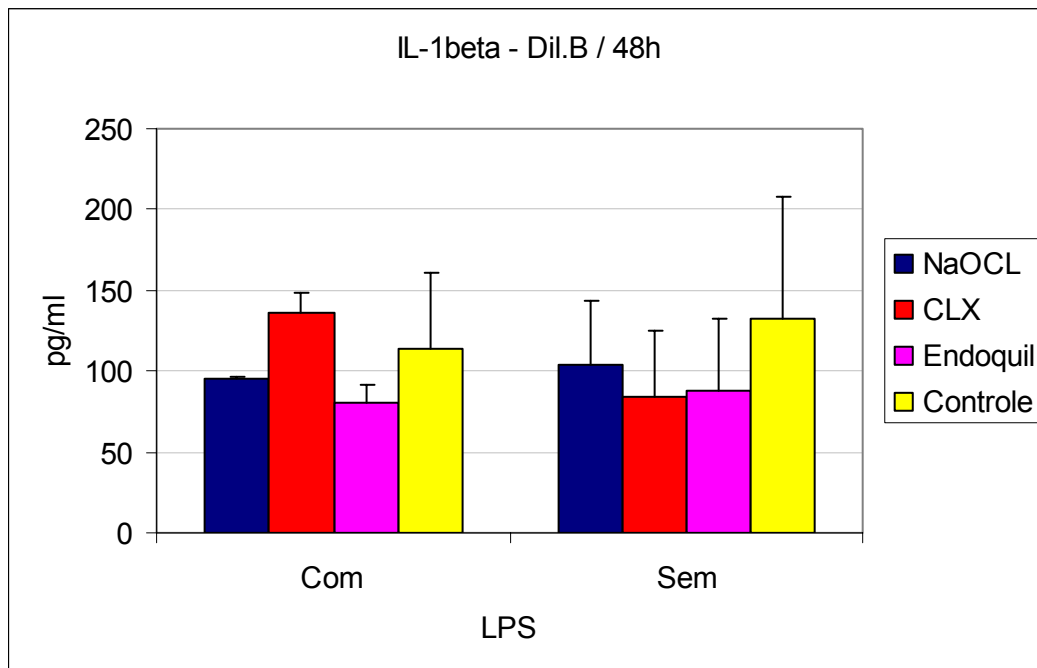


Gráfico 5.15 – concentrações (média e dp) de IL- 1 β (pg/ml) na diluição B (48h)

IL – 6

Os valores médios de IL-6 (pg/ml) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos na tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Média e desvio padrão das concentrações de IL-6 (pg/ml) em todos os grupos estudados.

Dil.	Tempo	LPS	NaOCL		CLX		Endoquil		Controle	
			média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
A	24h	Com	229,71	57,40	40,59	2,08	242,94	51,99	416,18	92,34
		Sem	127,65	2,91	55,59	4,99	193,53	19,55	191,47	3,33
	48h	Com	240,88	27,45	32,94	2,08	385,29	103,57	350,51	0,31
		Sem	170,29	8,32	63,13	36,46	285,46	16,45	315,06	20,88
B	24h	Com	375,00	74,87	352,65	70,71	262,35	76,95	416,18	92,34
		Sem	217,94	65,72	179,12	8,32	230,88	37,44	191,47	3,33
	48h	Com	300,29	37,44	280,29	0,00	294,41	89,01	350,51	0,31
		Sem	251,50	51,62	153,99	46,82	183,80	29,08	315,06	20,88

24 HORAS

De acordo com as tabelas 5.17 e 5.18 e o gráfico 5.16, a produção basal de IL-6 não foi alterada pelos tratamentos utilizando-se os agentes na diluição A, havendo redução da produção pelo grupo tratado com a clorexidina. Quando estimulados pelo LPS, houve uma diminuição significativa da produção de IL-6 pelo grupo tratado com clorexidina em relação ao controle, mostrando que ela parece ter inibido o efeito estimulatório do LPS. O aumento da produção dessa citocina pelos grupos tratados com hipoclorito e endoquil foi inferior ao

apresentado pelo controle, parecendo ter reduzido parcialmente o efeito pró-inflamatório do LPS.

Os grupos tratados com os agentes na menor concentração (B) (Tabelas 5.17 e 5.19 e Gráfico 5.17) apresentaram comportamentos semelhantes, não havendo diferença entre os grupos nas variáveis analisadas.

Tabela 5.18 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição A

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	ns	<0,05*
NaOCL A x Controle	ns	ns
Endoquil A x CLX A	ns	<0,05*
Endoquil A x NaOCL A	ns	ns
NaOCL A x CLX A	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela 5.19 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição B

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	ns	ns
CLX B x Controle	ns	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	ns	ns
Endoquil B x NaOCL B	ns	ns
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

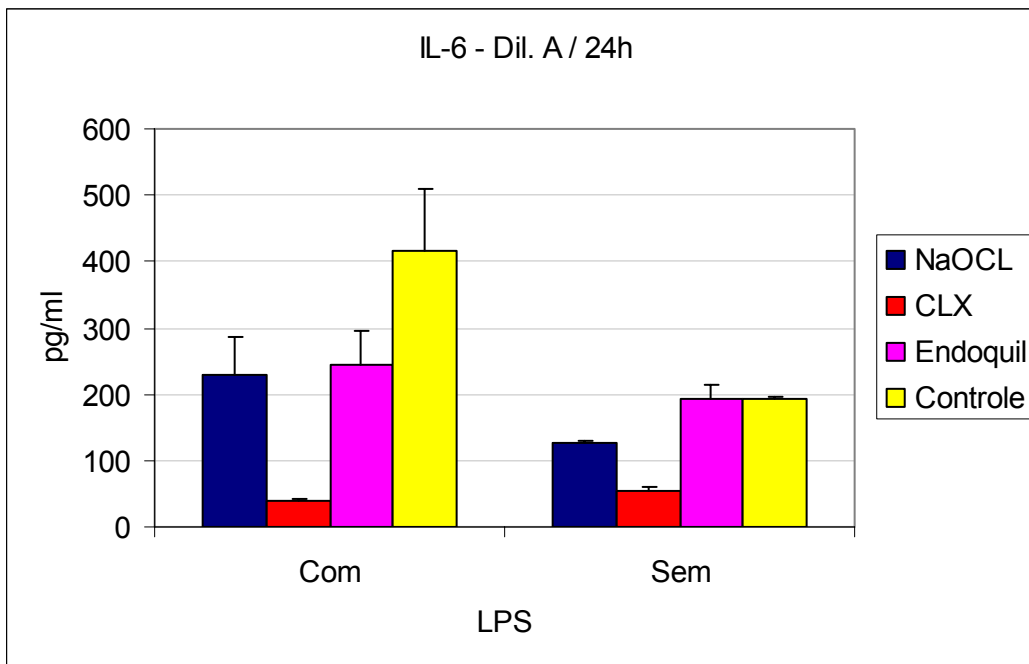


Gráfico 5.16 – concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição A (24h)

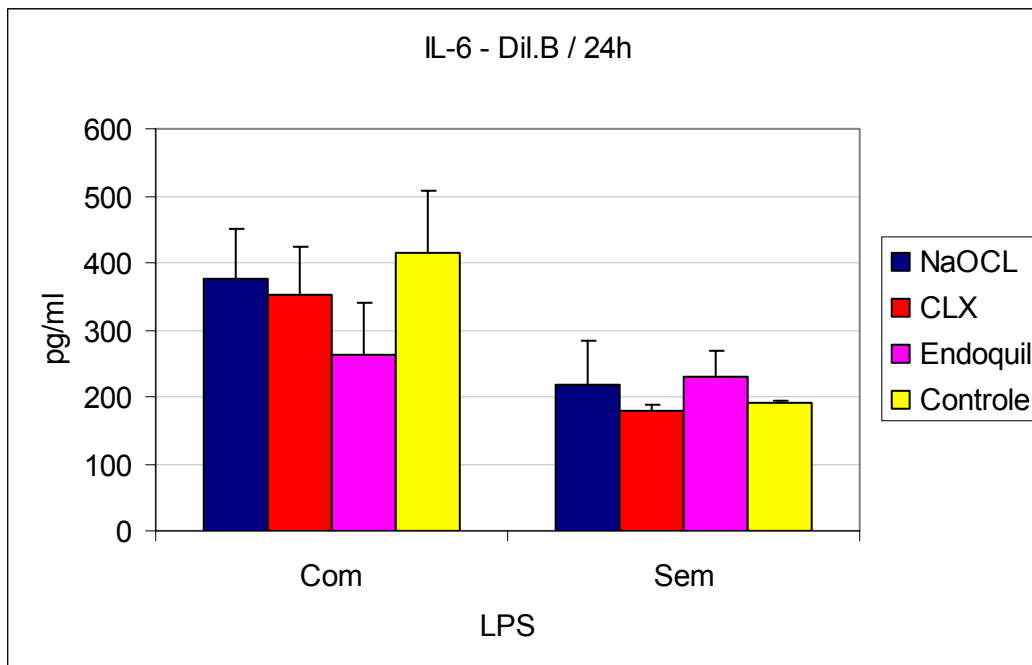


Gráfico 5.17 – concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição B (24h)

48 HORAS

As tabelas 5.17 e 5.20 e o gráfico 5.18 demonstram os grupos tratados com clorexidina e hipoclorito na diluição A, apresentaram redução na produção de IL-6 em relação aos demais tratamentos na condição basal. Quando estimulados com LPS, os grupos tratados com clorexidina e hipoclorito tiveram comportamento semelhante ao apresentado em 24 horas. O grupo tratado com Endoquil na diluição A apresentou aumento da produção de IL-6 após estímulo com LPS.

Nas concentrações menores dos agentes (B), segundo as tabelas 5.17 e 5.21 e o gráfico 5.19, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos grupos não estimulados por LPS, embora os grupos tratados com clorexidina e Endoquil levaram a uma redução parcial da produção de IL-6. Após estímulo com LPS não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 5.20 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição A

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	<0,05*	<0,05*
NaOCL A x Controle	ns	ns
Endoquil A x CLX A	<0,05*	<0,05*
Endoquil A x NaOCL A	ns	ns
NaOCL A x CLX A	ns	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.21 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a IL-6 (pg/ml) na diluição B

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	ns	ns
CLX B x Controle	ns	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	ns	ns
Endoquil B x NaOCL B	ns	ns
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

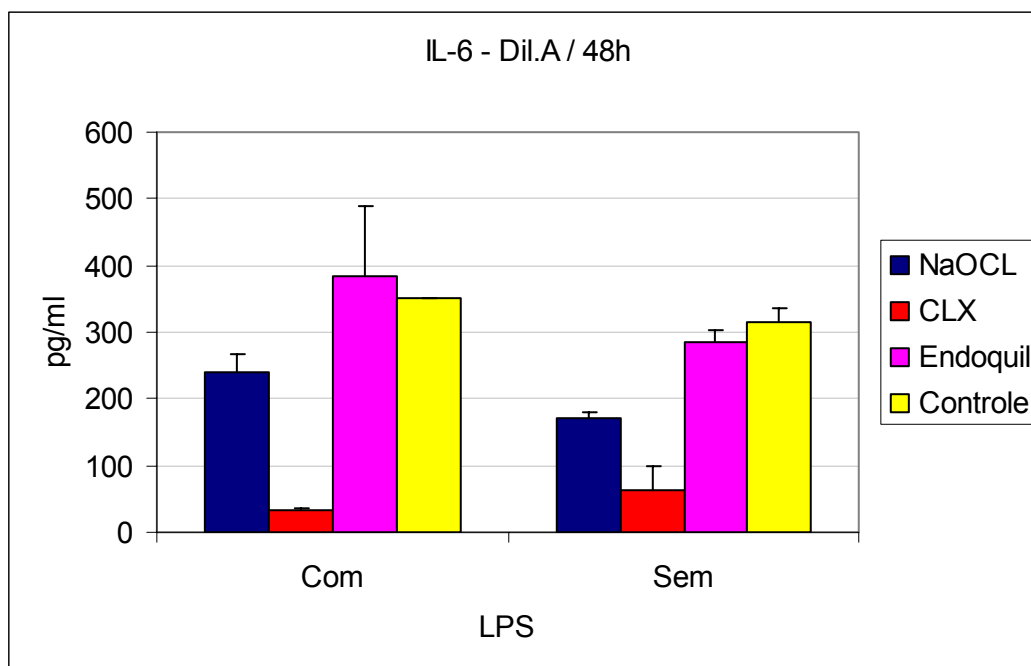


Gráfico 5.18 – concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição A (48h)

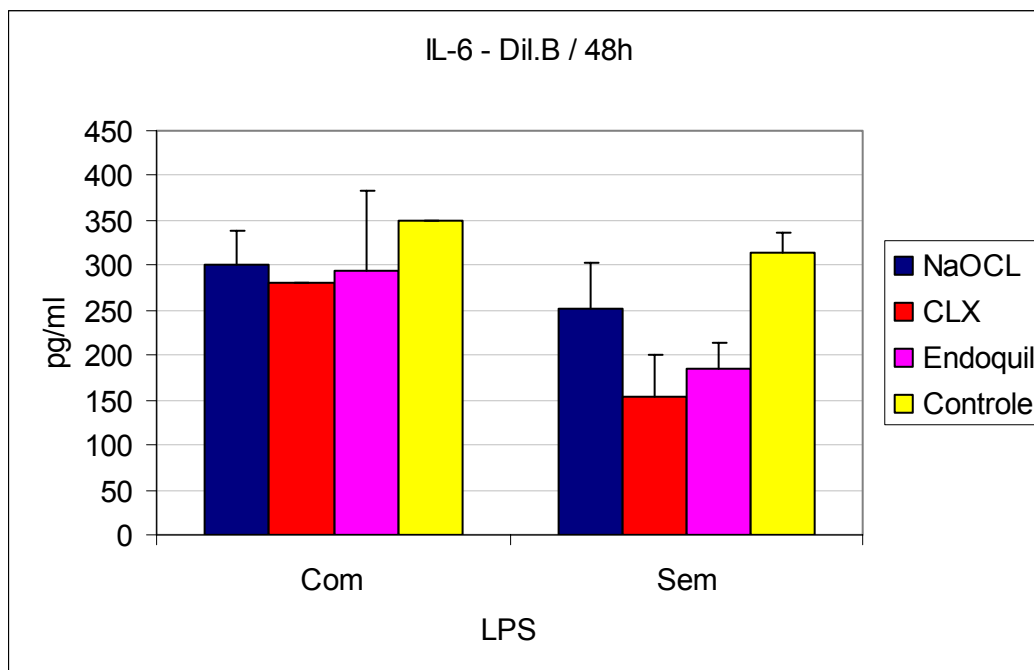


Gráfico 5.19 – concentrações (média e dp) de IL- 6 (pg/ml) na diluição B (48h)

Quando analisados separadamente, o comportamento do hipoclorito de sódio, da clorexidina e do Endoquil não foi alterado em virtude da adição do LPS, do aumento do tempo e da diminuição da concentração na produção da citocina IL-6 (Apêndice A).

TNF- α

Os valores médios de TNF- α (pg/ml) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos na tabela 5.22.

Tabela 5.22 – Média e desvio padrão das concentrações de TNF- α (pg/ml) em todos os grupos estudados

Dil.	Tempo	LPS	NaOCL		CLX		Endoquil		Controle	
			média	dp	média	Dp	média	dp	média	dp
A	24h	Com	339,75	60,10	5,00	6,01	35,00	21,57	183,50	38,54
		Sem	137,75	9,19	4,00	13,79	31,50	6,72	80,75	6,36
	48h	Com	100,50	8,84	-25,50	6,72	39,50	25,81	130,83	68,00
		Sem	71,75	12,02	11,67	58,57	46,17	66,35	84,50	74,60
B	24h	Com	212,50	42,07	176,25	50,91	49,75	31,11	183,50	38,54
		Sem	66,00	9,55	31,50	1,06	45,50	29,34	80,75	6,36
	48h	Com	101,50	3,89	99,75	0,71	62,50	17,32	130,83	68,00
		Sem	93,50	83,09	96,00	65,41	75,33	86,38	84,50	74,60

24 HORAS

De acordo com as tabelas 5.22 e 5.23 e o gráfico 5.20, no estado basal, o grupos tratados com os agentes na maior concentração (A), não apresentaram diferenças significativas em relação à síntese de TNF- α , embora tenha sido verificado aumento da produção dessa citocina no grupo tratado com hipoclorito em relação ao controle. O grupo tratado com hipoclorito de sódio apresentou aumento da produção de TNF α em relação ao controle, indicando exacerbação do efeito estimulatório de LPS. Os grupos tratados com clorexidina e Endoquil, por

sua vez, apresentaram redução parcial da produção dessa citocina, indicando comprometimento parcial do efeito estimulatório do LPS.

Os grupos tratados com os agentes na menor concentração (B), segundo as tabelas 5.22 e 5.24 e o gráfico 5.21, não apresentaram diferença significativa na produção de TNF α , independente de serem estimulados ou não. No entanto, após estímulo com LPS, todos os grupos apresentaram aumento da produção dessa citocina, com exceção do grupo tratado com Endoquil.

Tabela 5.23 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição A

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	ns	ns
NaOCL A x Controle	ns	ns
Endoquil A x CLX A	ns	ns
Endoquil A x NaOCL A	ns	<0,05*
NaOCL A x CLX A	ns	<0,05*

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 5.24 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 24 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição B.

Grupos (24 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	ns	ns
CLX B x Controle	ns	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	ns	ns
Endoquil B x NaOCL B	ns	ns
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

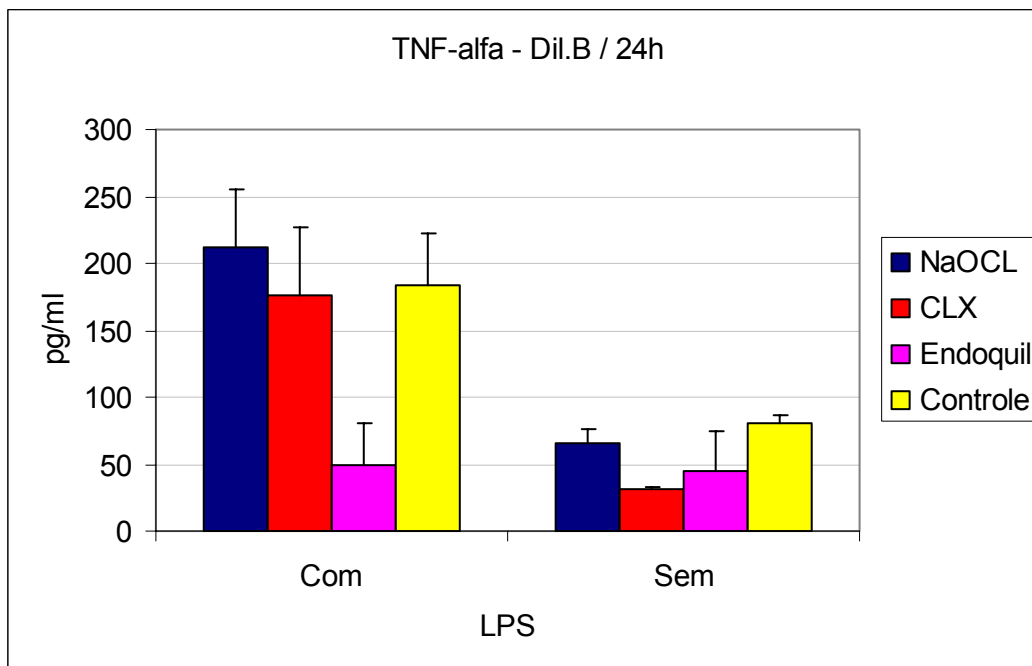


Gráfico 5.20 – concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição A (24h)

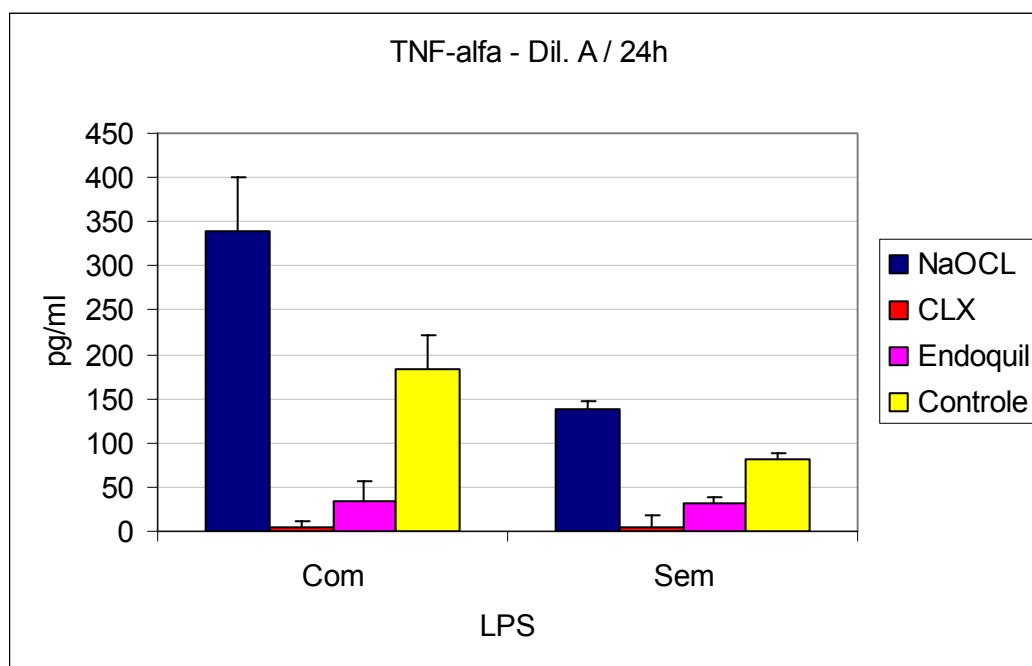


Gráfico 5.21 – concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição B (24h)

48 HORAS

As tabelas 5.22 e 5.25 e o gráfico 5.22 ilustram os resultados encontrados no tempo de 48 horas. Avaliando-se o comportamento dos agentes na maior concentração (A), não foi verificada diferença significativa entre eles em relação à produção de TNFa, embora, tanto no estado basal, quanto após estímulo com LPS, houve redução da produção dessa citocina pelo grupo tratado com clorexidina. Avaliando-se o tratamento com os agentes na menor concentração (B), segundo as tabelas 5.22 e 5.26 e o gráfico 5.23, os grupos não tiveram diferenças significantes em relação à produção de TNFa, independente de serem estimulados ou não.

Tabela 5.25 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição A

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil A x Controle	ns	ns
CLX A x Controle	ns	ns
NaOCL A x Controle	ns	ns
Endoquil A x CLX A	ns	ns
Endoquil A x NaOCL A	ns	ns
NaOCL A x CLX A	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela 5.26 – Resultado das comparações múltiplas das substâncias em 48 horas para a TNF- α (pg/ml) na diluição B

Grupos (48 horas)	Sem LPS	Com LPS
Endoquil B x Controle	ns	ns
CLX B x Controle	ns	ns
NaOCL B x Controle	ns	ns
Endoquil B x CLX B	ns	ns
Endoquil B x NaOCL B	ns	ns
NaOCL B x CLX B	ns	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

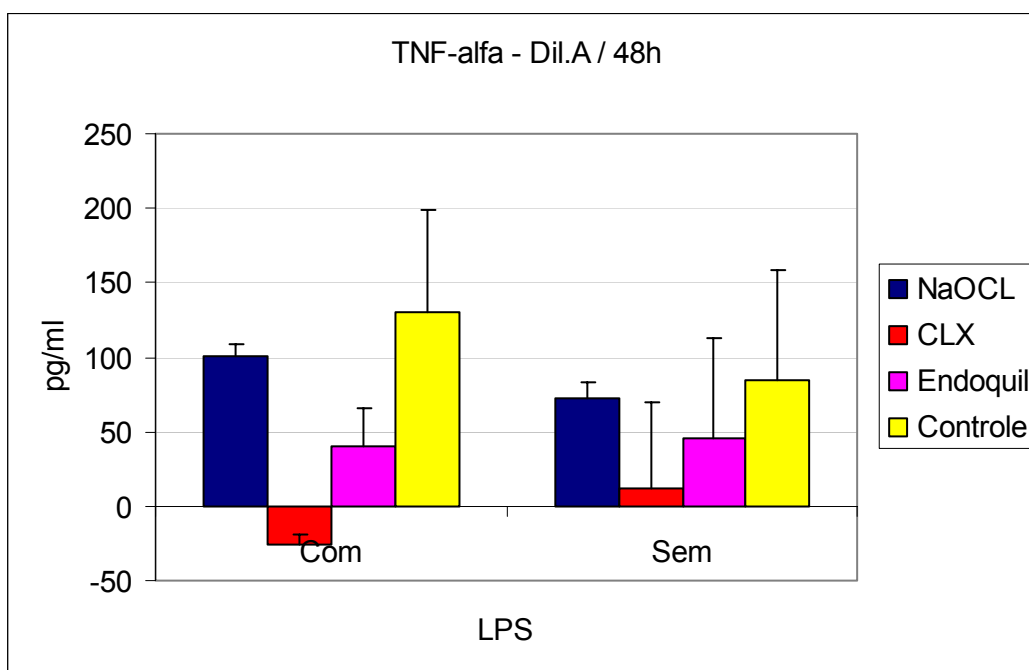


Gráfico 5.22 – concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição A (48h)

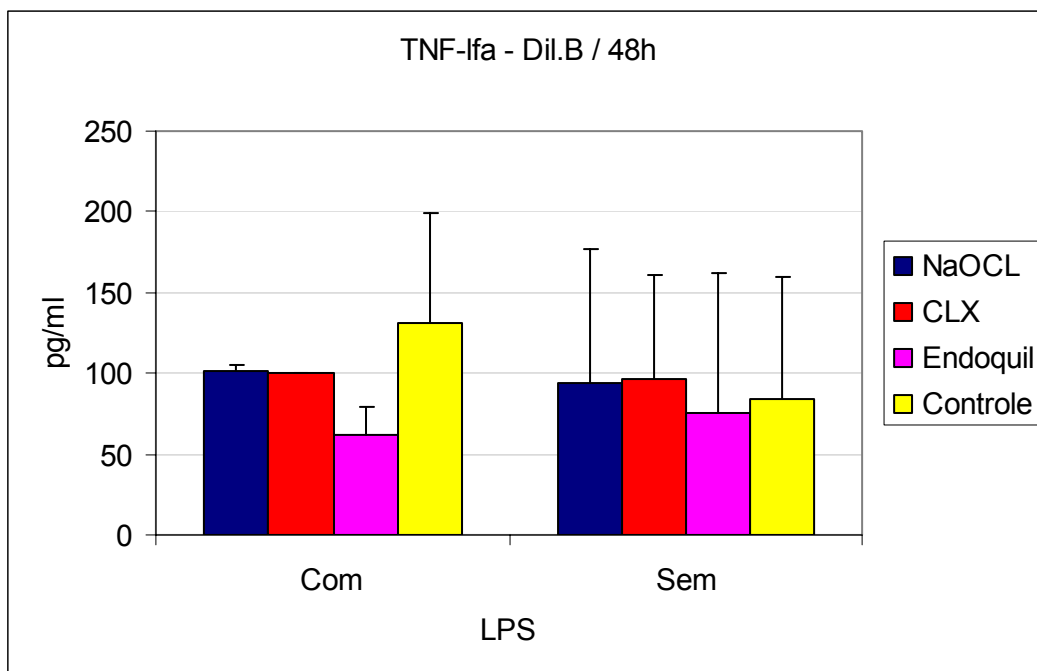


Gráfico 5.23 – concentrações (média e dp) de TNF- α (pg/ml) na diluição B (48h)

Quando analisados separadamente, o comportamento do hipoclorito de sódio, da clorexidina e do Endoquil não foi alterado em virtude da adição do LPS, do tempo e da diminuição da concentração na produção da citocina TNF- α . No entanto, o grupo tratado com hipoclorito de sódio na concentração A e estimulado com LPS apresentou aumento significativo da produção dessa citocina em 24 horas e redução significativa em 48 horas (Apêndice A).

NO

Os valores médios de NO ($\mu\text{g/mL}$) e desvios padrão correspondentes aos grupos experimentais e seus respectivos tempos de observação estão expostos na tabela 5.27.

Tabela 5.27 – Média e desvio padrão das concentrações de NO (μM) em todos os grupos estudados

Dil.	Tempo	LPS	NaOCL		CLX		Endoquil		Controle	
			média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
A	24h	Com	25,31	11,93	3,13	1,77	178,44	5,75	268,44	42,87
		Sem	28,44	4,86	9,69	3,09	137,50	1,77	156,88	10,61
	48h	Com	168,75	10,61	27,50	8,84	290,94	8,40	186,40	208,38
		Sem	85,31	7,51	15,10	4,28	102,08	107,55	134,74	144,44
B	24h	Com	264,06	57,01	218,75	25,63	175,63	60,10	268,44	42,87
		Sem	63,88	84,68	100,94	13,70	174,38	38,89	156,88	10,61
	48h	Com	347,19	2,21	269,38	11,49	348,75	67,18	186,40	208,38
		Sem	132,55	144,88	41,06	36,51	144,53	159,77	134,74	144,44

Tabela 5.28 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, do fator LPS

Grupo	Média
SEM LPS	101,17 a
COM LPS	201,72 b

Grupos com a mesma letra não possuem diferença estatisticamente significante entre si

De acordo com a tabela 5.28, a adição de LPS influenciou o comportamento de todos os grupos na produção de NO.

Nas tabelas 5.27 e 5.29 e nos gráficos 5.24 e 5.25 observou-se que os grupos tratados com clorexidina e hipoclorito na concentração A apresentaram comprometimento da produção de NO, independentemente da adição do LPS, quando comparada com o controle e Endoquil no período de 24 horas. Em 48 horas, houve redução da produção de NO somente no grupo tratado com clorexidina, independente da adição de LPS.

Quando se comparou as substâncias na menor concentração (B) (Tabelas 5.27 e 5.30 e Gráficos 5.26 e 5.27), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos tempos analisados. Porém, nas primeiras 24 horas, observou-se uma tendência do Endoquil em comprometer o efeito estimulatório do LPS em relação à produção de NO quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5.29 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, dos fatores Substância e Diluição (A)

Grupos	Diferença
Endoquil A x Controle A	ns
CLX A x Controle A	<0,05*
NaOCL A x Controle A	ns
Endoquil A x CLX A	<0,05*
Endoquil A x NaOCL A	ns
NaOCL A x CLX A	ns

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela 5.30 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, dos fatores Substância e Diluição (B)

Grupos	Diferença
Endoquil B x Controle B	ns
CLX B x Controle B	ns
NaOCL B x Controle B	ns
Endoquil B x CLX B	ns
Endoquil B x NaOCL B	ns
NaOCL B x CLX B	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

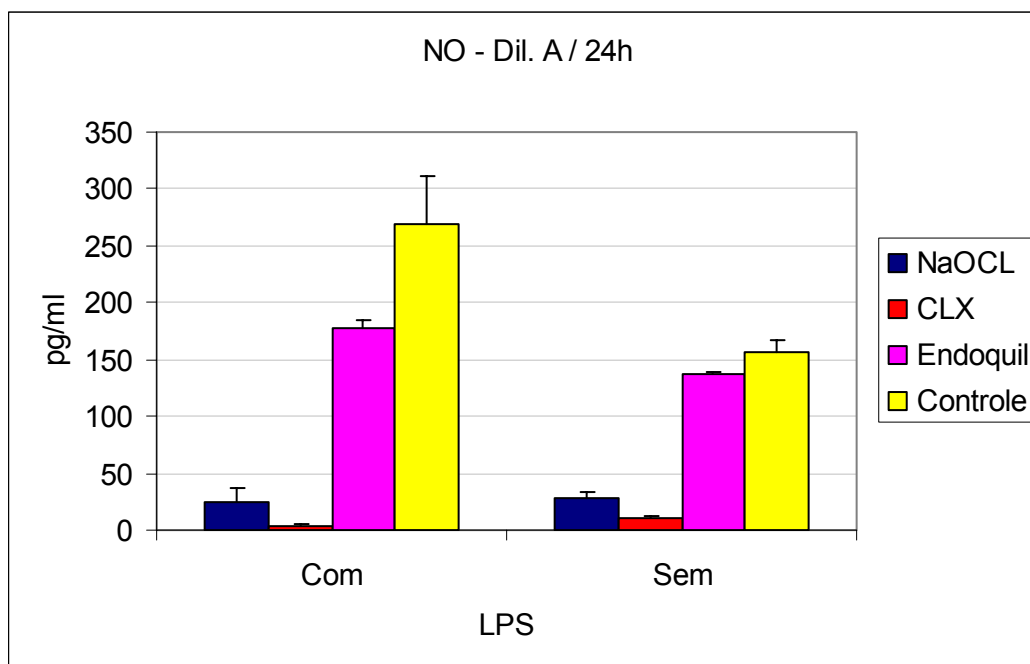


Gráfico 5.24 – concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição A (24h)

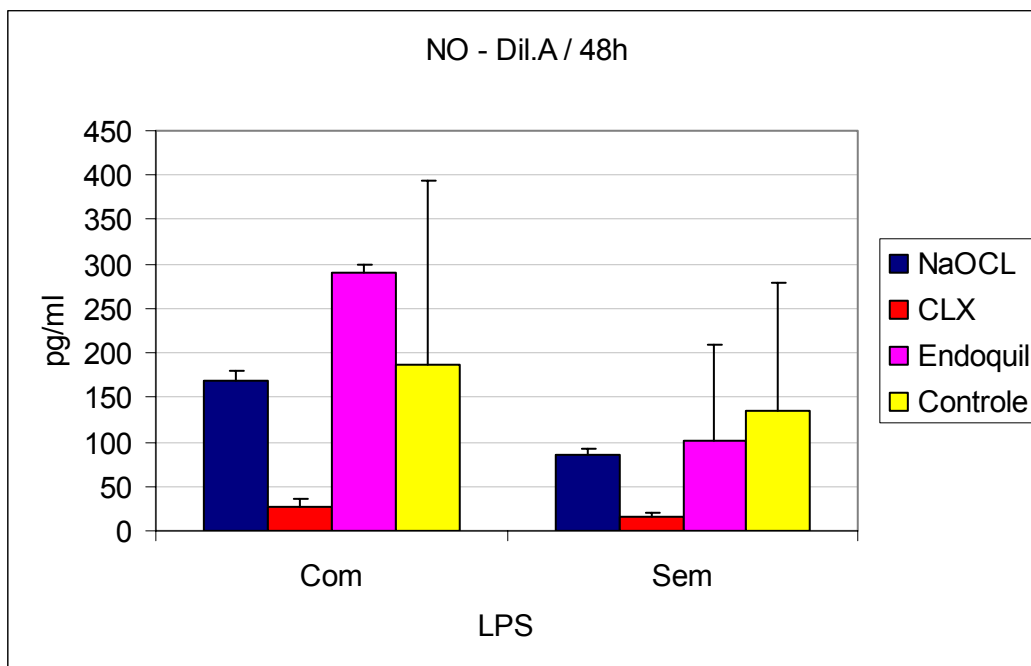


Gráfico 5.25 – concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição A (48h)

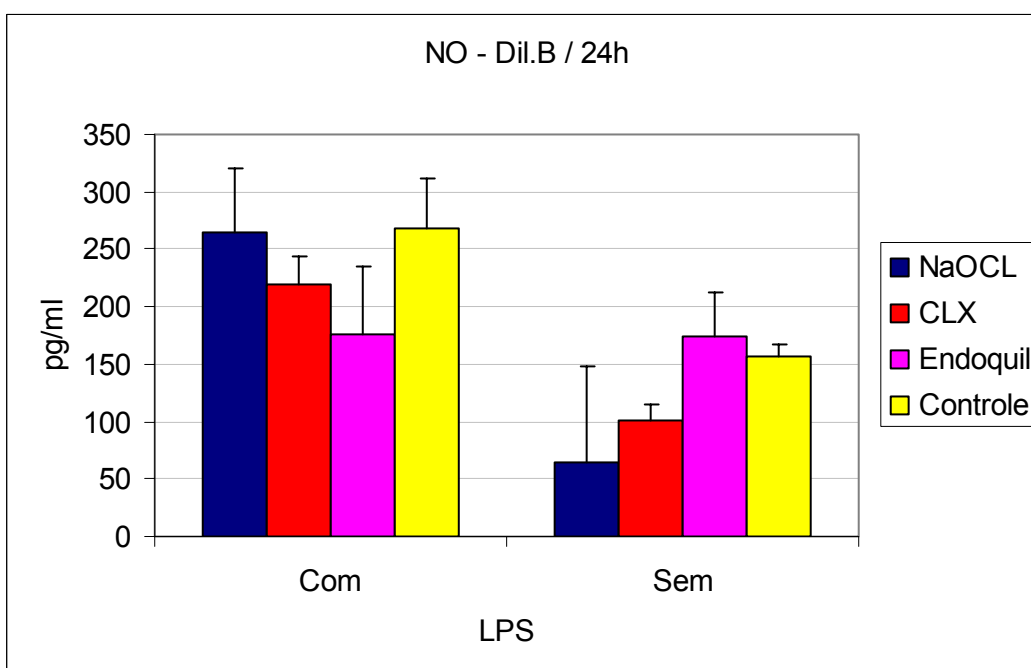


Gráfico 5.26 – concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição B (24h)

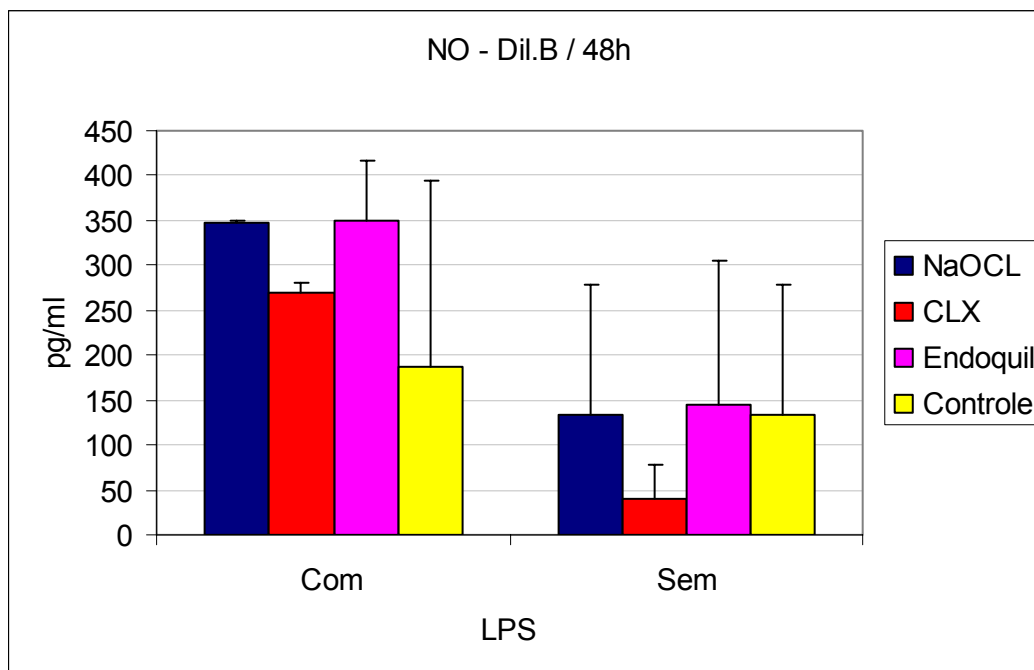


Gráfico 5.27 – concentrações (média e dp) de NO (μM) na diluição B (48h)

6 DISCUSSÃO

Atualmente, o nível das pesquisas realizadas em Endodontia tem alcançado padrões de excelente qualidade. Para tanto, existe uma variedade grande nas opções de metodologias, entre elas os testes primários (hematogênicos e de cultura celular), secundários (implantes em subcutâneo de ratos, camundongos e *guinea pig*) e os tradicionais clínico/microscópicos (dentes de cães, gatos, macacos, cavalos e humanos) (Yesilsoy et al., 1995; Lamano Carvalho et al., 1997; Suguimoto, 1997; Bianconcini; Gavini, 2001; Öñçag et al., 2003; Ribeiro et al. 2004; Gomes-Filho et al., 2008; Gül et al., 2009).

No que diz respeito à ética em pesquisa, existe uma tendência em aplicar os conhecimentos primeiramente em âmbito laboratorial e, uma vez obtidos os resultados, avaliar as possibilidades de extrapolação para os estudos *in vivo* (Ringel et al., 1982; Ferreira et al., 1999; Leonardo et al., 1999; Öñçag et al., 2003; Siqueira, 2005).

Experimentos com culturas celulares (fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, linfócitos) têm sido empregados para avaliação da citotoxicidade de diversos materiais, entre eles as soluções irrigadoras utilizadas na terapia endodôntica (Heling et al., 2001; Ribeiro, 2003; Burgos, 2005; Hernandez et al., 2005; Malheiros et al., 2005; Fidalgo et al., 2007; Gül et al., 2009; Simbula et al., 2010).

No presente estudo, avaliou-se o comportamento biológico a partir do contato das substâncias irrigadoras com células inflamatórias mononucleares.

Optou-se pela metodologia da cultura celular utilizando macrófagos provenientes da linhagem de camundongos C57BL/6J (isogênica) por ser uma

técnica já bem estabelecida por Bonini (1999), sendo a mais utilizada no laboratório onde a pesquisa foi desenvolvida, além de ser indicada para os ensaios de produção de óxido nítrico e de citocinas (visto que a produção dessas espécies está diretamente relacionada à ativação mediada por LPS). Para Hyakuna et al. (1989), além das vantagens da simplicidade técnica, o cultivo celular pode ser considerado uma metodologia bastante sensível, de baixo custo, rapidez e que respeita a bioética.

Durante o tratamento endodôntico, independentemente das condições locais, a substância irrigadora utilizada pode extrair além do ápice, entrar em contato com os tecidos adjacentes e provocar reação inflamatória local, edema, parestesia ou até mesmo necrose tecidual, além da sintomatologia pós-operatória, como relatado por Reeh e Messer (1989), Ingram (1990), Deonízio et al. (2002) e Motta et al. (2009).

Em se tratando de um dente que apresenta vitalidade pulpar, a região periapical está normalmente isenta de infecção, e com inflamação suave ou moderada, devido às alterações pulpares. Predominam aí fibroblastos e células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares (Cohen; Burns, 1991). As reações provenientes deste contato são coordenadas principalmente pelos macrófagos.

Quando o dente em questão apresenta necrose pulpar, geralmente o tecido que está presente no periápice tem predominância de células polimorfonucleares com poucas mononucleadas, nos processos agudos, e predominância de tecido de granulação nos processos crônicos (Cohen; Burns, 1991). Em ambas as situações, ocorre a mudança no perfil destes tecidos inflamados aguda ou cronicamente, para tecido de granulação, onde predominam os macrófagos, que

aí também regem o processo de reparo (Leonardo; Leal, 1991; Tanomaru Filho et al., 2002). Estas células são encontradas em grande quantidade nas lesões periapicais (granulomas e cistos), justificada pelo fato de participarem não só da resposta imune específica como também da inespecífica, quando recruta outros macrófagos para atuar na região onde ocorreu o extravasamento (Kopp; Schwarting, 1989).

Independentemente do quadro microscópico local, a substância irrigadora extravasada é considerada para o organismo um corpo estranho. O reconhecimento desta “estranheza” é feito pelo complexo maior de histocompatibilidade, presente nos linfócitos T e macrófagos. A partir deste reconhecimento, o macrófago inicia o processo de fagocitose (Syrjänen et al., 1986).

A utilização de substâncias biologicamente compatíveis é o objetivo do endodontista para minimizar os efeitos deletérios que por ventura elas possam causar nestas situações de extravasamento apical. Para tanto é fundamental a realização de pesquisas que possam avaliar tais efeitos (Malheiros et al., 2005; Amaral et al., 2007). O método do MTT, utilizado neste trabalho, é considerado um bom índice para avaliar a citotoxicidade dos materiais utilizados em odontologia e tem sido empregado por inúmeros autores. (Bonacorsi et al., 2004; Amaral et al., 2007; Navarro-Escobar, 2010). A nossa escolha se deu por favorecer a avaliação dos grupos experimentais em diferentes tempos de observação: curto, médio e longo prazos. Ao término de cada período, a viabilidade celular foi determinada. O MTT é um produto que inicialmente se encontra solúvel, porém quando incorporado pelas células viáveis e metabolizado por enzimas mitocondriais, adquire a forma de cristais insolúveis. A solubilização

destes cristais pelo SDS, permite a mudança de cor do meio de cultura, possibilitando o cálculo da absorbância em leitora ELISA a 550nm. Quanto maior for a concentração celular, maior será a metabolização de corante MTT e consequentemente os valores de absorbância serão mais elevados.

Segundo Zhang et al. (2003) a vantagem deste método é a simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e não exigir a utilização de radioisótopos. A experiência que tivemos neste estudo corrobora as afirmações acima, pois, uma vez determinado todo o delineamento experimental, a execução se tornou mais fácil. Por termos optado por avaliar três substâncias em duas concentrações e três períodos, o planejamento criterioso do experimento foi determinante para a conclusão do mesmo.

Dependendo das características intrínsecas da substância, durante este processo ocorre a “liberação” de citocinas como, por exemplo, Interleucinas e fatores de crescimento (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e TNF- β) que, segundo Stashenko (1990), Kawashima et al. (1996) e Amaral et al. (2007) exercem um grande poder nos processos de reabsorções ósseas inflamatórias. Algumas citocinas como IL-1 β , estimulam a produção de outras que estão relacionadas ao processo de dor, induzindo a liberação de metabólitos do ácido aracdônico (Lim et al., 1994).

Outras citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-6, IL-8 e IL-12, podem ser secretadas pelos macrófagos quando estes são estimulados pelo LPS, um potente iniciador microbiano (Dobrovolskaia; Vogel, 2002) ou atuarem como mediadoras endógenas da inflamação (Beutler; Rietschel, 2003).

Neste trabalho, as citocinas escolhidas para avaliação foram as que consideramos mais relevantes - IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α - para demonstrar o comportamento das substâncias irrigadoras de acordo com o encontrado na

literatura. A metodologia utilizada para quantificar a síntese destas citocinas foi baseada em imunoenensaio do tipo Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), usando kits específicos, de acordo com as orientações do fabricante, assim como nos trabalhos de Lara et al. (2003), Amaral et al. (2007) e Da Silva et al. (2008).

O óxido nítrico é outro radical livre que apresenta importante papel na patologia e fisiologia humana; é secretado pelos macrófagos em resposta à presença do LPS (Fujihara et al., 2003). Ele possui íntima relação com o processo inflamatório e sua magnitude, quando liberado em grandes quantidades pode potencializar o processo induzindo às reabsorções inflamatórias (Sales et al., 2008).

Os níveis de óxido nítrico podem ser determinados pela análise colorimétrica da reação de Griess (1879). O aumento de sua concentração promove um conseqüente aumento da citotoxicidade do material, portanto este mediador também foi por nós estudado como parâmetro de citotoxicidade auxiliando na compreensão da biocompatibilidade das soluções irrigadoras.

Cabe salientar aqui alguns pontos relativos ao nosso trabalho que foram fundamentais ou decisivos para o delineamento dos ensaios realizados.

A princípio, no projeto desta pesquisa, havíamos nos programado em realizar a coleta de células provenientes de camundongos Swiss machos. Como já relatado anteriormente, optou-se pela utilização de linhagem C57BL/6J (isogênica), aumentando a confiabilidade da amostra, uma vez que estes animais possuem a mesma constituição genética, como gêmeos univitelinos. A alteração do gênero não teve influência na pesquisa, já que as células foram coletadas imediatamente após o sacrifício dos animais, sem alterar o perfil hormonal e o metabolismo celular característico das fêmeas.

No procedimento de coleta das células, a penetração da agulha poderia inadvertidamente perfurar algum órgão da cavidade abdominal do animal, por exemplo, o intestino e trazer na amostra microrganismos provenientes desta região. Ou então, coletar um número muito grande de hemáceas, o que não é indicado. Nestas situações, o material foi desprezado.

Com o objetivo de evitar possíveis erros de pipetagem, calibração, alíquotagem, entre outros, utilizou-se os valores das curvas-padrão como parâmetros para cada intervalo de tempo proposto em cada um dos ensaios, sendo estas realizadas sempre concomitantemente às amostras experimentais.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos do laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, seguindo rigorosamente as normas de biossegurança.

As substâncias, meios de cultura e reagentes foram devidamente preparados ou estocados, e armazenados conforme especificações de cada produto. Das soluções irrigadoras testadas, o hipoclorito de sódio a 1% e o digluconato de clorexidina a 2% foram manipulados em farmácia específica para este fim (Fórmula & Ação), mantidos ao abrigo da luz e refrigerados, respeitando os devidos prazos de validade. O detergente derivado do óleo de mamona foi gentilmente cedido pelo professor Gilberto Orivaldo Chierice, do Instituto de Química de São Carlos da USP e mantido segundo sua orientação, ao abrigo da luz e refrigerado.

O papel desempenhado pelas soluções irrigadoras em Endodontia vem sendo objeto de inúmeras pesquisas. É incessante a busca por uma substância que seja capaz de abranger todas as propriedades ideais (Ingle; Taintor, 1985).

Neste contexto, o hipoclorito de sódio, desde sua introdução por Walker (1936) e a clorexidina sugerida por Rölla et al. (1971) são destaque na grande maioria dos tratamentos. Entretanto, a utilização de diferentes concentrações e metodologias de estudo dificulta sobremaneira a interpretação dos trabalhos e suas aplicações clínicas.

Quanto mais elevada a sua concentração, melhor é o efeito antimicrobiano, entretanto, seu emprego deve ser feito de forma criteriosa para evitar que alcance o periápice, causando severa reação inflamatória. Por outro lado, as baixas concentrações, apesar de bem toleradas pelos tecidos, podem reduzir consideravelmente seu poder de desinfecção. Esta afirmação pode ser comprovada no estudo de Öncag et al. (2003) que, ao utilizarem o hipoclorito de sódio a 5,25% verificaram um aumento de citotoxicidade quando comparado com o digluconato de clorexidina a 2% e Cetrexidin. Por outro lado, ao compararem a clorexidina na concentração de 0,12% com o hipoclorito de sódio a 1 e 5% e com ela mesma a 0,5 e 1%, Sassone et al. (2003) observaram que ela foi inefetiva na eliminação do *E. faecalis*.

Entretanto, alguns autores são unânimes em afirmar que a clorexidina só não é a solução irrigadora de escolha, porque seu poder antimicrobiano e seu baixo efeito tóxico são insuficientes para compensar sua incapacidade de dissolução de matéria orgânica (Jeansonne; White, 1994; White et al., 1997).

No presente trabalho, optou-se por estudar o hipoclorito de sódio a 1%, baseando-se no trabalho de Simões et al. (1989) que demonstraram que o hipoclorito de sódio nesta concentração já possui efeito antimicrobiano, quando comparado com a concentração de 0,5%, sem aumentar sua toxicidade, se

utilizado na concentração de 5%. Estes efeitos também foram encontrados por Spangberg et al. (1973).

Siqueira Jr et al. (1998) apontaram a seguinte forma decrescente de atividade antimicrobiana: hipoclorito de sódio a 4%, 2,5%, clorexidina a 2%, 0,2%, EDTA a 17%, ácido cítrico a 10% e hipoclorito de sódio a 0,5%. Estes resultados confirmam nossa idéia de manter comparações entre soluções com concentrações semelhantes.

Gordon et al. (1981) verificaram a atuação do hipoclorito de sódio a 1%, 3% e 5% na dissolução de tecido pulpar vivo e necrótico. Todos tiveram comportamento semelhante, exceto na concentração menor, que dissolveu menos tecido no tempo estabelecido. Os autores sugeriram que as maiores concentrações poderiam ser usadas, porém advertiram sobre os problemas de toxicidade que elas poderiam causar. Não acreditamos que esta opção seja a mais indicada uma vez que as injúrias causadas pelo extravasamento desta solução em maiores concentrações, por si só contra indicariam o seu uso.

Fidalgo et al. (2007) analisando a citotoxicidade do hipoclorito de sódio em cultura de osteoblastos humanos verificaram que o contato por 30 segundos com a substância nas concentrações 0,5%, 1% 2,5% e 5,25% provocaram 100% de morte celular. Daí a necessidade de efetuar diluições maiores, como por nós realizadas, para a viabilização dos experimentos. Logicamente, que guardando as devidas proporções, os resultados podem ser extrapolados para a realidade clínica.

O uso de substâncias irrigadoras com concentrações iguais, hipoclorito de sódio e clorexidina a 0,2%; hipoclorito de sódio e clorexidina a 2%, promoveu um

comportamento semelhante no que diz respeito à eliminação do microrganismo *E. faecalis* (Vahdaty et al., 1993).

Por esta razão, pode-se entender que o digluconato de clorexidina na concentração a 2% seria a escolha mais adequada para realizar a comparação com o hipoclorito de sódio a 1%, ambos largamente empregados na prática endodôntica incluindo a instituição de origem desta pesquisa, além de ter sido anteriormente por nós estudado, mantendo assim, uma seqüência na linha de pesquisa (Siqueira, 2005).

Considerando ainda a busca pela solução irrigadora ideal, e seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde, que recomenda o uso de produtos de origem animal, vegetal ou mineral, a utilização do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pelo professor Gilberto Orivaldo Chierice, tem sido sugerida não só por suas excelentes propriedades biológicas, como também pela atividade antimicrobiana, demonstrada por Ferreira et al. (1999).

De um modo geral, os derivados do óleo de mamona estão sendo empregados em diversas áreas da Odontologia. A biocompatibilidade da poliuretada derivada do óleo de mamona empregada em alvéolos de ratos, cavalos e tecido ósseo foi objeto de inúmeros estudos (Ignácio, 1995; Araújo et al., 1996; Sugimoto, 1997; Lamano Carvalho et al., 1997; Garcia Jr, 2000; Calixto, 2001; Ribeiro, 2003). Todos os autores observaram em seus resultados um comportamento altamente biológico deste material.

Mais especificamente na área da endodontia, um polímero derivado do óleo de mamona tem sido usado como cimento obturador do canal radicular ou material retro-obturador para cirurgias periapicais. Os trabalhos evidenciaram que

estes materiais possuem baixa toxicidade e bom selamento e por estas razões, indicariam a sua utilização na terapia endodôntica, porém com ressalvas da necessidade de novos experimentos que possam comprovar estas e outras propriedades (Pascon et al., 2001; Camargo et al., 2007; Camargo, 2008).

A capacidade de limpeza ou remoção da smear layer do detergente derivado de mamona também foi comprovada nos estudos de Teixeira et al. (2001), Yamashita et al. (2004) e Meneghin et al. (2006).

Já a propriedade antimicrobiana desta solução irrigadora foi objeto da grande maioria das pesquisas nesta área. Diversas metodologias foram sugeridas para esta avaliação comparando-a com as mais diversas substâncias - gel de papaína, hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, paramonoclofenol canforado, solução de hidróxido de cálcio e extratos de aloe Vera, de gengibre e de Barbatimão. Os trabalhos mostraram boa capacidade antimicrobiana do detergente derivado do óleo de mamona (Ferreira et al., 1999; Ferreira, 1999; Leonardo et al., 2001; Siqueira, 2005; Takano et al., 2007; Miranda et al., 2008; Shygei et al., 2008).

Desta forma, foi agregado a este estudo o detergente derivado do óleo de mamona, para que fosse possível confrontá-lo com o hipoclorito de sódio a 1% e a clorexidina a 2%, avaliando o comportamento biológico destas substâncias.

A citotoxicidade das soluções irrigadoras vem sendo estudada por diversos autores, porém em muitos casos, fazendo comparações entre soluções com concentração muito distintas. Tanomaru Filho et al. (2002) compararam o hipoclorito de sódio a 5,25% com o digluconato de clorexidina a 2% em relação ao reparo apical. Seus resultados evidenciaram que a clorexidina promoveu um resultado mais satisfatório. Em nosso trabalho, utilizou-se uma concentração

menor do hipoclorito, por acreditarmos que, como no trabalho acima citado, ele poderia exercer um efeito mais citotóxico devido a sua concentração.

Quando se optou por realizar duas diluições para cada solução irrigadora, pretendíamos justamente comparar e afirmar que, aumentando a concentração promoveríamos este efeito mais citotóxico. No ensaio do MTT, nossos resultados evidenciaram que apenas o digluconato de clorexidina a 2% apresentou toxicidade na diluição B, após 72 horas. Já na concentração A sua influência negativa ocorreu já nas primeiras 12 horas.

Estes resultados demonstram que a atuação da clorexidina permaneceu no decorrer do tempo, podendo ser atribuída ao fato dela possuir a propriedade de substantividade. Em determinadas situações, esta característica faz dela uma excelente solução antimicrobiana, como citado no trabalho de White et al. (1997) que observaram um efeito residual de 72 horas na concentração de 2% e, a 0,12% permaneceu efetiva por até 12 horas. Já em Basrani et al. (2002) este efeito residual foi detectado em até uma semana.

Silva (1999) verificou in vivo que tanto o hipoclorito de sódio a 1% quanto a clorexidina a 2% possuíam potencial antimicrobiano, porém na atividade residual de 7 dias, a clorexidina foi mais eficiente. Acredita-se que esta capacidade de atuação também foi preservada em nosso ensaio, uma vez que na análise de tempo mais longa (5 e 7 dias), o efeito citotóxico da clorexidina foi observado nas duas concentrações avaliadas. Já o hipoclorito de sódio a 1% e o Endoquil se comportaram de maneira semelhante ao grupo controle.

O trabalho de Weber et al. (2003) também relatou uma atividade antimicrobiana tardia (7 dias) da clorexidina a 2% quando comparada com o hipoclorito de sódio a 5,25%. O que nos faz acreditar que mesmo aumentando a

concentração do hipoclorito de sódio, seu efeito residual é inferior ao da clorexidina. Nesta pesquisa não se realizaram comparações entre as substâncias com concentrações diferentes, para evitarmos possíveis erros na interpretação dos resultados.

Ainda discorrendo sobre a clorexidina, encontramos no trabalho de Silva et al. (2008) uma metodologia semelhante a utilizada por nós. Eles avaliaram a associação do digluconato de clorexidina a 0,4% à pasta de hidróxido de cálcio utilizando os ensaios de MTT; dosagem de NO e citocinas (IL-1 α e TNF- α). Seus resultados evidenciaram que a clorexidina não alterou o comportamento celular, diferentemente dos nossos e dos encontrados por Hernandez et al. (2005). Este fato talvez possa ser explicado pela baixa concentração de clorexidina utilizada, não compatível com as indicações clínicas.

No presente estudo, a clorexidina mais concentrada apresentou elevado índice de toxicidade nas primeiras 24 horas que aumentou conforme o passar do tempo e, posteriormente na concentração mais diluída. Os resultados encontrados por Bonacorsi et al. (2004) vão de encontro aos nossos reafirmando a diminuição tardia da viabilidade celular provocada pela clorexidina. Também verificaram que a mesma não induziu a síntese de NO pelos macrófagos, novamente, confirmando os resultados desta pesquisa.

A reação tecidual em subcutâneo de ratos foi avaliada por Gomes-Filho et al. (2008) frente ao uso da solução salina a 0,9%; hipoclorito de sódio a 2,5% e 5,25%; digluconato de clorexidina a 2% em solução e gel. O hipoclorito mais concentrado se mostrou o mais irritante com elevado número de células inflamatórias. Talvez este fato se deva tão somente a esta elevada concentração,

pois no trabalho em questão, o comportamento do hipoclorito de sódio foi melhor que o da clorexidina, salientando a sua menor concentração.

Tal fato pôde ser confirmado por Gül et al. (2009) que analisaram o hipoclorito de sódio em diversas concentrações e concluíram que quanto mais concentrada a solução, maior a frequência de micronúcleos, células apoptóticas e binucleadas.

As citocinas envolvidas nos processos inflamatórios exercem alto poder reabsortivo (Stashenko, 1990), além de intensificarem a sintomatologia dolorosa (Lim et al., 1994). Sendo assim, a substância irrigadora ideal deveria, no mínimo, diminuir a síntese destas citocinas. De um modo geral, o comportamento das soluções neste trabalho foi bastante variável no que diz respeito à síntese de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α .

O hipoclorito de sódio a 1%, principalmente quando mais concentrado, teve uma tendência a estimular a produção destas citocinas, na maioria dos tempos. O digluconato de clorexidina a 2% variou o comportamento frente à síntese das citocinas, ora intensificava o estímulo, ora reduzia, de acordo com as concentrações e tempos, porém sempre mantendo uma influência no processo. O detergente derivado do óleo de mamona de certo modo não foi capaz de influenciar a produção das citocinas.

A escassez de trabalhos utilizando os derivados do óleo de mamona nos fez diversificar as comparações em relação aos achados de biocompatibilidade. Apesar da diferença de material e sua aplicação, o trabalho de Bonini (1999) nos pareceu relevante no que diz respeito à metodologia. A autora avaliou a resposta inflamatória à poliuretana da mamona (indicada para a reconstrução de órgãos e tecidos) utilizando o modelo experimental de cultura celular proveniente de

camundongos isogênicos C57BL/6, na síntese de óxido nítrico, assim como neste estudo. Seus achados evidenciaram que a poliuretana revelou-se não-citotóxica ao interagir com os macrófagos em cultura, além induzir a liberação de NO a níveis baixos, demonstrando um comportamento favorável à biocompatibilidade. Tal fato também foi encontrado no nosso ensaio de liberação de óxido nítrico, uma vez que o detergente derivado do óleo de mamona não comprometeu a síntese deste composto.

Diante do exposto, é lúcido afirmar que independentemente da solução irrigadora utilizada, o seu extravasamento inadvertido à região periapical, poderia comprometer o reparo biológico ou intensificar o processo inflamatório e a reabsorção óssea. Torna-se difícil saber qual seria a substância e a concentração mais indicada, entretanto para a correta escolha, não somente o comportamento biológico, como também as propriedades físicas, químicas e microbianas devem ser consideradas.

Nas condições experimentais deste estudo, observou-se que o digluconato de clorexidina apresentou maior citotoxicidade em relação às outras substâncias e que o detergente derivado do óleo de mamona manteve um comportamento biológico, não influenciando na síntese de citocinas e óxido nítrico, sendo um bom indicativo para a realização de mais pesquisas para elucidar os efeitos citotóxicos destas substâncias.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas neste estudo, concluiu-se que:

Ensaio de viabilidade celular do MTT

- O digluconato de clorexidina a 2%, nas duas concentrações estudadas, se comportou de maneira mais citotóxica que o hipoclorito de sódio a 1% e o detergente derivado do óleo de mamona;
- Após 48 horas, a solução de clorexidina mais concentrada provocou morte celular e, em 5 dias, este fato pode ser observado também na concentração mais diluída;

Ensaio de liberação de citocinas

- **IL-1 α** : o hipoclorito de sódio a 1% e o digluconato de clorexidina a 2% induziram a produção de IL-1 α , enquanto que o detergente derivado do óleo de mamona diminuiu esta produção, não influenciando na síntese desta citocina;
- **IL-1 β** : o hipoclorito de sódio a 1% e o digluconato de clorexidina a 2% mais concentrados exacerbaram o efeito do LPS, enquanto que o detergente derivado do óleo de mamona reduziu este efeito;
- **IL- 6**: o digluconato de clorexidina a 2% mais concentrado inibiu o efeito estimulatório do LPS, diminuindo a síntese da citocina em 24

horas. O hipoclorito de sódio a 1% e o detergente derivado do óleo de mamona aumentaram a produção de IL- 6, porém inferior ao controle;

- **TNF – α** : o digluconato de clorexidina a 2% e o detergente derivado do óleo de mamona diminuíram a síntese de TNF – α , enquanto que o hipoclorito de sódio a 1% aumentou esta produção, em 24 horas. Após 48 horas, somente hipoclorito de sódio a 1% manteve a diminuição.

Ensaio de síntese de óxido nítrico

O digluconato de clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio a 1% comprometeram a síntese de óxido nítrico, mesmo estimulados pelo LPS, em 24 horas. Após 48 horas, apenas a clorexidina manteve esta inibição.

Das três soluções irrigadoras testadas parece oportuno dizer que:

O digluconato de clorexidina a 2% apresentou citotoxicidade maior em relação ao hipoclorito de sódio a 1% e ao detergente derivado do óleo de mamona. O comportamento delas foi bastante variável em relação à síntese de citocinas e óxido nítrico, porém o detergente derivado do óleo de mamona foi a substância que menos influenciou nas sínteses de citocinas e óxido nítrico.

REFERÊNCIAS¹

Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J* 2007;40(5):338-43.

Amaral KF, Borelli P, Gavini G. Síntese de IL-1b e TNF-a em cultura de macrófagos condicionadas com soluções desmineralizantes. *Pesquisa Odont Bras.* 2006; 20:278.

Araújo CACA, Teófilo JM, Brentegani LG. Cronologia de reparo alveolar do rato após implante de *Ricinus communis*. *Anais da XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*; 1-4 set 1996; Águas de São Pedro, BR. Águas de São Pedro : SBPQO; 1996. p.120.

Basrani B et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2002;94(2):240-5.

Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3:169-176.

Bianconcini IV, Gavini G Avaliação da citotoxicidade do digluconato de clorexidina a 2,5% e a 5%, do hipoclorito de sódio a 1% e do soro fisiológico, em subcutâneo de ratos. *Braz Oral Res* 2001;15(1):73.

Bonacorsi C, Raddi MSG, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(2):207-212.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bonini, S. Avaliação da resposta inflamatória à poliuterana derivada do óleo de mamona. Estudo experimental em camundongos [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto;1999.

Burgos PEG. Avaliação da citotoxicidade da solução de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, sobre fibroblastos do ligamento periodontal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2005.

Calixto RFE. Implante de um floculado de resina derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2001.

Camargo CHR. Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos endodônticos em diferentes linhagens celulares [Tese Livre Docência]. São José dos Campos – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista. 2008.

Camargo SEA et al. Subcutaneous tissue reaction to pulp capping materials in rats. Annals of 85th General Session & Exhibition of the IADR. New Orleans; 2007

Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 5ed. St. Louis, Mosby-Year Book Inc, 1991.

Deonízio MDA, Gavini G, Pontarolo R. Estudo comparativo da extrusão apical, produzida por duas diferentes técnicas mecânico-rotatórias. Pesq Bras Odontol, 2002; 16(1):130.

Dobrovolskaia MA, Vogel, SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. Microbes and infection. 2002; 4:903-14.

Ferreira CM, Fröner IC, Ito IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigants solutions in teeth with pulpar necrosis. *Braz Dent J* 1999;10(1):15-21.

Ferreira CM. Avaliação “*in vitro*” da atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas em Endodontia sobre as bactérias anaeróbias [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 1999.

Fidalgo TKS et al. Análise *in vitro* da citotoxicidade do hipoclorito de sódio em osteoblastos humanos. *Braz Oral Res* 2007;21(1):74.

Fujihara M, Muroi M, Takamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: role of the receptor complex. *Pharmacology and Therapeutics*.2003;100 (2):171-94.

Garcia JR IR. Utilização dos implantes de polímero – Medpor, poliuretana de mamona e matriz óssea bovina em defeitos ósseos maxilares. Análise histológica e histométrica em macacos coelhos [tese]. Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia; 2000.

Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MMTM, Bernabé PFE. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):137-44.

Gomes-Filho JE. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod*. 2010;36(10):1698-702.

Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod* 1981; 7(10):466-469.

Griess P *Ber Deutsch Chem Ges* 1879; 12: 426–8.

Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc* 1941; 28(2):223-5.

Gül S, Savsar A, Tayfa Z. Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*. 2009;59:113-9.

Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. *J Endod* 2001; 27(4):278-80.

Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. *Int Endod J*. 2005;38:137-43.

Hyakuna K et al. The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J Biomed Mater Res* 1989; 23(9):1049-66.

Ignácio H. Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em coelhos [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 1995.

Ingle JI; Taintor JF. *Endodontics*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985.

Ingram TA. Response of the human eye to accidental exposure to sodium hypochlorite. *J Endod* 1990; 16(5):235-8.

Jeansone MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20(6):276-278.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molar: A quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996; 22(6):311-6.

Kopp W, Schwarting R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod* 1989; 15 (2):72-5.

Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Citotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod* 1999; 25(1):21-23.

Lamano Carvalho TL Araújo CA, Teófilo JM, Brentegani LG. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. *Int J Oral Max Surg* 1997;26(2)149-52.

Lara VS Figueiredo F, da Silva TA, Cunha FQ. Dentin-induced in vivo inflammatory response and in vitro activation of murine macrophages. *J Dent Res* 2003; 82(6):460-5.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 25(3):167-71.

Leonardo MR. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil – based irrigant. *J Endod* 2001;27(12):717-9.

Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia. Tratamento de canais radiculares*. 2.ed. São Paulo, Panamericana, 1991.

Lim GC et al. Interleukin 1- β in symptomatic and assymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994; 20(5);225-7.

Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro comparasion of the citotoxicity of citric acid and EDTA. *J Endod* 2005; 31(10):746-8.

Martins GB et al. Sealing ability of castor oil polymer as a root-end filling material. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(3):220-3.

Meneghin MP et al. Morphologic and morphometric analysis of the root canal third cleaning after biomechanical preparation using 3.3% *ricinus communis* detergent and 1% NaOCL as irrigating solutions. J Appl Oral Sci. 2006; 14(3):178-82.

Miranda MA et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de soluções do Barbatimão, da mamona e da clorexidina a 2% em microorganismos anaeróbios. Braz Oral Res 2008; 22(1):271.

Motta MV, Chaves-Mendonca MAL, Stirton CG, Cardozo HF. Accidental injection with sodium hypochlorite: report of a case. Int Endod J. 2009;42:175-82.

Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.3% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(1):e90-4.

Önçag Ö, Hosgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu, D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J. 2003;36:423-32.

Pascon EA, Souza CJA, Langeland K. Biocompatibility of endodontic materials: cytotoxicity of a polyurethane resin derived from castor beam oil. Braz Endod J. 2001;5:5-12.

Pashley EL et al. Citotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod 1985; 11(12):525-8.

Reeh ES, Messer HH. Long-term paresthesia following inadvertent forcing of sodium hypochlorite through perforation in maxillary incisor. Endod Dent Traumat 1989; 5(4):200-3.

Ribeiro DA, Bazo AP, da Silva Franchi CA, Marques MEA, Salvadori DMF. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. J Periodont Res. 2004;39(5):358-61.

Ribeiro MG. Avaliação clínica e histológica do implante de poliuretano de mamona (*Ricinus communis*) no espaço alveolar após exodontia do terceiro pré-molar inferior. Estudo experimental em equinos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.

Ringel AM et al. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod* 1982; 8(5):200-204.

Rolla G, Loe H, Rindom-Schiott C. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archs Oral Biol* 1971; 16:1109-16.

Sales KU et al. Morpho-functional alterations in murine resident macrophages culture treated with 17% EDTA and 15% Citric acid. *Int Endod J*, 2008 (In Press).

Sassone LM, Fidel RAS, Fidel SR, Dias M, Hirata Jr R. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCL and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J*. 2003;14(2):99-102.

Scelza MFZ et al. Citotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod* 2001;27(12):741-3.

Shygei E et al. Análise da atividade antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares e extratos naturais sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. *Braz Oral Res* 2008; 22(1):62.

Silva CAG. Efetividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e clorexidina como irrigantes endodônticos [dissertação]. Porto Alegre – Universidade Luterana do Brasil, 1999.

Silva RAB et al. Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264,7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(5):e44-e51.

Simbula G, Dettori C, Camboni T, Cotti E. Comparison of Tetraacetylenediamine + Sodium perborate and Sodium hypochlorite cytotoxicity on L929 fibroblasts. J Endod. 2010; 36(9):1516-20.

Simões W, Sampaio JMP, Debelian GD. Verificação da tolerância tecidual e poder bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% usados na clínica odontológica. Rev Paul Odontol 1989; 11(4):35-41.

Siqueira DCR. Avaliação comparativa *in vivo* da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, utilizados como soluções irrigadoras em Endodontia [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2005.

Siqueira JR JF et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod 1998; 24(6): 414-416.

Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1973; 36(6):856-71.

Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. Endod Dent Traumatol 1990; 6():89-96.

Suguimoto RM. Implante de polímero de mamona (*Ricinus communis*) sobre o mento. Estudo histológico em macacos [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia; 1997.

Syrjänen S, Nilner K, Hensten-Pettersen A. *In vitro* testing of dental materials by means of macrophage cultures I: Methodological aspects. J Biomed Mater Res 1986; 20(8):1111-23.

Takano EH et al. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*.) Cienc Rural 2007; 37(5):1235-40.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. J Endod 2002; 28(4):295-299.

Teixeira FB et al. Remoção de *smear layer* dos canais radiculares utilizando o irrigante Endoquil. RBO 2001;58(6):424-6.

Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. Endod Dent Traumatol 1993; 9(6):243-248.

Walker A. Definite and dependable therapy for pulpless teeth. J Am Dent Assoc 1936; 23(8):1418-1425.

Weber CD et al. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod 2003; 29(9):562-4.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997; 23(4): 229-231.

Yamashita JC et al. Avaliação de superfícies biomecanizadas utilizando diferentes soluções irrigadoras. In: V Jornada Odontológica: "Madre Mary Clare Millea" – Universidade do Sagrado Coração, 2004. Anais.

Yesilsoy C et al. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod 1995; 21(10):513-515.

Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-Tetrazolium method. J Endod 2003; 29(10): 654-7.

APÊNDICE A- Tabelas complementares das comparações realizadas na análise estatística.

MTT

Tabela A.1 – Análise de variância a dois critérios para comparação entre Substâncias e Tempos, na diluição A.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	4,1036E+11	92	2,683E+09	152,96	<0,001*
Tempo	6	3,377E+11	92	2,683E+09	125,87	<0,001*
Subst.xTempo	18	2,5172E+10	92	2,683E+09	9,3823	<0,001*

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Z

Tabela A.2 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, na diluição A.

Grupo	Média	
CLX 5d	-61.375	A
CLX 7d	-53.625	A
CLX 72h	-10.333	a b
CLX 48h	8.333	a b c
CLX 24h	137.000	b c d
NaOCL 72h	155.000	c d
Endoquil 7d	157.375	d
NaOCL 7d	162.125	d
Controle 7d	172.625	d
CLX 12h	198.625	d e
NaOCL 5d	217.625	d e f
Endoquil 5d	220.875	d e f
Controle 72h	224.333	d e f
Controle 5d	230.875	d e f
Endoquil 72h	262.333	d e f g
Controle 12h	305.125	e f g h
Endoquil 12h	338.125	f g h i
NaOCL 12h	381.125	g h i
NaOCL 4h	402.875	g h i j
NaOCL 48h	405.000	g h i j
Controle 48h	423.667	g h i j k
Endoquil 48h	428.333	h i j k
CLX 4h	446.875	i j k
Controle 4h	454.125	i j k
Endoquil 4h	461.125	i j k
Controle 24h	520.500	j k
NaOCL 24h	529.000	j k
Endoquil 24h	561.500	k

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significativas entre si.

Tabela A.3 – Análise de variância a dois critérios para comparação entre Substâncias e Tempos, na diluição B.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	1,0806E+11	92	2,42E+09	44,668	<0,001*
Tempo	6	5,4317E+11	92	2,42E+09	224,52	<0,001*
Subst.xTempo	18	2,0237E+10	92	2,42E+09	8,365	<0,001*

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.4 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, na diluição B.

Grupo	Média	
CLX 7d	-143.625	a
CLX 5d	-26.375	a b
CLX 72h	109.667	b c
Endoquil 7d	143.875	c
NaOCL 7d	161.375	c
Controle 7d	172.625	c d
NaOCL 72h	193.000	c d e
NaOCL 5d	213.625	c d e
Endoquil 5d	217.875	c d e
Controle 72h	224.333	c d e f
Controle 5d	230.875	c d e f
Endoquil 72h	304.333	d e f g
CLX 48h	315.667	e f g h
CLX 12h	361.125	f g h i
NaOCL 4h	391.875	g h i
NaOCL 12h	392.375	g h i
Endoquil 12h	397.375	g h i j
Endoquil 48h	413.667	g h i j k
NaOCL 48h	419.667	g h i j k
Controle 48h	423.667	g h i j k
Endoquil 4h	428.625	g h i j k
CLX 4h	450.125	h i j k
Controle 12h	454.125	i j k
Controle 4h	454.125	i j k
Controle 24h	520.500	j k l
CLX 24h	542.500	k l
Endoquil 24h	615.500	l
NaOCL 24h	616.500	l

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si.

IL – 1 α

Tabela A.5 – Análise de variância a quatro critérios para comparação entre Substâncias, Diluições, Tempos e LPS.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	75516,50	32	665,11	113,54	<0,001*
Diluição	1	20893,87	32	665,11	31,41	<0,001*
Tempo	1	17065,26	32	665,11	25,66	<0,001*
LPS	1	32969,88	32	665,11	49,57	<0,001*
Subs. X Dil.	3	5185,77	32	665,11	7,80	<0,001*
Subs. X Tempo	3	1784,47	32	665,11	2,68	0,063 ns
Dil. X Tempo	1	2033,16	32	665,11	3,06	0,090 ns
Subs. X LPS	3	1682,71	32	665,11	2,53	0,075 ns
Dil. X LPS	1	1719,54	32	665,11	2,59	0,118 ns
Tempo X LPS	1	2380,10	32	665,11	3,58	0,068 ns
Subs. X Dil. X Tempo	3	2317,79	32	665,11	3,48	0,027*
Subs. X Dil. X LPS	3	1969,87	32	665,11	2,96	0,047*
Subs. X Tempo X LPS	3	3994,96	32	665,11	6,01	0,002*
Dil. X Tempo X LPS	1	1704,55	32	665,11	2,56	0,119 ns
Subs. X Dil. X Tempo X LPS	3	739,87	32	665,11	1,11	0,359 ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.6 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey.

Grupo	Média
Endoquil B 48h SEM	143,55 a
Endoquil A 48h SEM	160,22 a b
Controle A 24h SEM	164,57 a b
Controle B 24h SEM	164,57 a b
Endoquil A 24h SEM	166,38 a b c
Endoquil B 24h SEM	180,43 a b c d
Endoquil B 24h COM	191,01 a b c d e
NaOCL B 24h SEM	213,48 a b c d e f
Endoquil A 24h COM	214,42 a b c d e f
CLX B 24h SEM	219,64 a b c d e f
Endoquil B 48h COM	229,93 a b c d e f g
Controle B 48h SEM	250,58 b c d e f g
Controle A 48h SEM	250,58 b c d e f g
Controle A 24h COM	257,75 b c d e f g h
Controle B 24h COM	257,75 b c d e f g h
Endoquil A 48h COM	272,75 c d e f g h i
Controle A 48h COM	281,16 d e f g h i
Controle B 48h COM	281,16 d e f g h i
NaOCL B 48h SEM	291,52 e f g h i
NaOCL B 48h COM	297,39 e f g h i
NaOCL B 24h COM	315,80 f g h i
CLX B 24h COM	326,67 g h i
CLX B 48h SEM	358,26 h i
NaOCL A 24h SEM	359,06 h i
CLX A 24h SEM	360,51 h i
CLX A 48h COM	360,87 h i
NaOCL A 48h COM	361,38 h i
CLX A 24h COM	362,39 h i
NaOCL A 24h COM	363,55 h i
NaOCL A 48h SEM	364,20 h i
CLX B 48h COM	368,41 i
CLX A 48h SEM	368,55 i

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si.

Tabela A.7 – Resultado das comparações múltiplas do Endoquil em 24/48 horas para a IL-1 α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 24h com LPS	ns
Endoquil A 48h sem LPS x Endoquil A 48h com LPS	<0,05*
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 24h com LPS	ns
Endoquil B 48h sem LPS x Endoquil B 48h com LPS	ns
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 48h sem LPS	ns
Endoquil A 24h com LPS x Endoquil A 48h com LPS	ns
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 48h sem LPS	ns
Endoquil B 24h com LPS x Endoquil B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa
* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela A.8 – Resultado das comparações múltiplas do NaOCL em 24/48 horas para a IL-1 α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 24h com LPS	ns
NaOCL A 48h sem LPS x NaOCL A 48h com LPS	ns
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 24h com LPS	ns
NaOCL B 48h sem LPS x NaOCL B 48h com LPS	ns
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 48h sem LPS	ns
NaOCL A 24h com LPS x NaOCL 48h com LPS	ns
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 48h sem LPS	ns
NaOCL B 24h com LPS x NaOCL B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.9 – Resultado das comparações múltiplas do Digluconato de Clorexidina em 24/48 horas para a IL-1 α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
CLX A 24h sem LPS x CLX A 24h com LPS	ns
CLX A 48h sem LPS x CLX A 48h com LPS	ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 24h com LPS	<0,05*
CLX B 48h sem LPS x CLX B 48h com LPS	ns
CLX A 24h sem LPS x CLX A 48h sem LPS	ns
CLX A 24h com LPS x CLX A 48h com LPS	ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 48h sem LPS	<0,05*
CLX B 24h com LPS x CLX B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela A.10 – Resultado das comparações múltiplas dos Controles em 24/48 horas para a IL-1 α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Controle A 24h sem LPS x Controle A 24h com LPS	ns
Controle A 48h sem LPS x Controle A 48h com LPS	ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 24h com LPS	ns
Controle B 48h sem LPS x Controle B 48h com LPS	ns
Controle A 24h sem LPS x Controle A 48h sem LPS	ns
Controle A 24h com LPS x Controle A 48h com LPS	ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 48h sem LPS	ns
Controle B 24h com LPS x Controle B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

IL – 1 β

Tabela A.11 – Análise de variância a quatro critérios para comparação entre Substâncias, Diluições, Tempos e LPS.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	3460,92	32	1100,34	3,15	0,039*
Diluição	1	5486,63	32	1100,34	4,99	0,033*
Tempo	1	53,13	32	1100,34	0,05	0,827 ns
LPS	1	14153,84	32	1100,34	12,86	0,001*
Subs. X Dil.	3	2521,01	32	1100,34	2,29	0,097 ns
Subs. X Tempo	3	1798,64	32	1100,34	1,63	0,201 ns
Dil. X Tempo	1	4848,61	32	1100,34	4,41	0,044*
Subs. X LPS	3	1846,85	32	1100,34	1,68	0,191 ns
Dil. X LPS	1	93,67	32	1100,34	0,09	0,772 ns
Tempo X LPS	1	15168,32	32	1100,34	13,79	0,001*
Subs. X Dil. X Tempo	3	2236,16	32	1100,34	2,03	0,129 ns
Subs. X Dil. X LPS	3	251,47	32	1100,34	0,23	0,876 ns
Subs. X Tempo X LPS	3	735,80	32	1100,34	0,67	0,577 ns
Dil. X Tempo X LPS	1	1023,26	32	1100,34	0,93	0,342 ns
Subs. X Dil. X Tempo X LPS	3	819,16	32	1100,34	0,74	0,534 ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

IL – 6

Tabela A.12 – Análise de variância a quatro critérios para comparação entre Substâncias, Diluições, Tempos e LPS.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	83146,61	32	2339,44	35,54	<0,001*
Diluição	1	64291,06	32	2339,44	27,48	<0,001*
Tempo	1	3912,02	32	2339,44	1,67	0,205 ns
LPS	1	130465,34	32	2339,44	55,77	<0,001*
Subs. X Dil.	3	41796,92	32	2339,44	17,87	<0,001*
Subs. X Tempo	3	4627,37	32	2339,44	1,98	0,137 ns
Dil. X Tempo	1	12191,20	32	2339,44	5,21	0,029*
Subs. X LPS	3	3487,82	32	2339,44	1,49	0,236 ns
Dil. X LPS	1	8605,66	32	2339,44	3,68	0,064 ns
Tempo X LPS	1	12717,24	32	2339,44	5,44	0,026*
Subs. X Dil. X Tempo	3	2657,53	32	2339,44	1,14	0,349 ns
Subs. X Dil. X LPS	3	7147,90	32	2339,44	3,06	0,042*
Subs. X Tempo X LPS	3	11050,34	32	2339,44	4,72	0,008*
Dil. X Tempo X LPS	1	401,10	32	2339,44	0,17	0,682 ns
Subs. X Dil. X Tempo X LPS	3	511,97	32	2339,44	0,22	0,883 ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.13 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey.

Grupo	Média
CLX A 48h COM	32,94 a
CLX A 24h COM	40,59 a
CLX A 24h SEM	55,59 a b
CLX A 48h SEM	63,13 a b c
NaOCL A 24h SEM	127,65 a b c d
CLX B 48h SEM	153,99 a b c d e
NaOCL A 48h SEM	170,29 a b c d e
CLX B 24h SEM	179,12 a b c d e f
Endoquil B 48h SEM	183,80 a b c d e f
Controle B 24h SEM	191,47 a b c d e f g
Controle A 24h SEM	191,47 a b c d e f g
Endoquil A 24h SEM	193,53 a b c d e f g
NaOCL B 24h SEM	217,94 a b c d e f g h
NaOCL A 24h COM	229,71 a b c d e f g h
Endoquil B 24h SEM	230,88 a b c d e f g h
NaOCL A 48h COM	240,88 b c d e f g h
Endoquil A 24h COM	242,94 b c d e f g h
NaOCL B 48h SEM	251,50 b c d e f g h
Endoquil B 24h COM	262,35 c d e f g h
CLX B 48h COM	280,29 d e f g h
Endoquil A 48h SEM	285,46 d e f g h
Endoquil B 48h COM	294,41 d e f g h
NaOCL B 48h COM	300,29 d e f g h
Controle B 48h SEM	315,06 d e f g h
Controle A 48h SEM	315,06 d e f g h
Controle B 48h COM	350,51 e f g h
Controle A 48h COM	350,51 e f g h
CLX B 24h COM	352,65 e f g h
NaOCL B 24h COM	375,00 f g h
Endoquil A 48h COM	385,29 g h
Controle A 24h COM	416,18 h
Controle B 24h COM	416,18 h

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significantes

Tabela A.14 – Resultado das comparações múltiplas do Endoquil em 24/48 horas para a IL-6 com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 24h com LPS	ns
Endoquil A 48h sem LPS x Endoquil A 48h com LPS	ns
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 24h com LPS	ns
Endoquil B 48h sem LPS x Endoquil B 48h com LPS	ns
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 48h sem LPS	ns
Endoquil A 24h com LPS x Endoquil A 48h com LPS	ns
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 48h sem LPS	ns
Endoquil B 24h com LPS x Endoquil B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.15 – Resultado das comparações múltiplas do NaOCL em 24/48 horas para a IL-6 com e sem LPS.

Grupos	Diferença
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 24h com LPS	ns
NaOCL A 48h sem LPS x NaOCL A 48h com LPS	ns
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 24h com LPS	ns
NaOCL B 48h sem LPS x NaOCL B 48h com LPS	ns
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 48h sem LPS	Ns
NaOCL A 24h com LPS x NaOCL 48h com LPS	Ns
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 48h sem LPS	Ns
NaOCL B 24h com LPS x NaOCL B 48h com LPS	Ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.16 – Resultado das comparações múltiplas do Digluconato de Clorexidina em 24/48 horas para a IL-6 com e sem LPS.

Grupos	Diferença
CLX A 24h sem LPS x CLX A 24h com LPS	Ns
CLX A 48h sem LPS x CLX A 48h com LPS	Ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 24h com LPS	Ns
CLX B 48h sem LPS x CLX B 48h com LPS	Ns
CLX A 24h sem LPS x CLX A 48h sem LPS	Ns
CLX A 24h com LPS x CLX A 48h com LPS	Ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 48h sem LPS	Ns
CLX B 24h com LPS x CLX B 48h com LPS	Ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.17 – Resultado das comparações múltiplas dos Controles em 24/48 horas para a IL-6 com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Controle A 24h sem LPS x Controle A 24h com LPS	<0,05*
Controle A 48h sem LPS x Controle A 48h com LPS	Ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 24h com LPS	<0,05*
Controle B 48h sem LPS x Controle B 48h com LPS	Ns
Controle A 24h sem LPS x Controle A 48h sem LPS	Ns
Controle A 24h com LPS x Controle A 48h com LPS	Ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 48h sem LPS	Ns
Controle B 24h com LPS x Controle B 48h com LPS	Ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

TNF- α

Tabela A.18 – Análise de variância a quatro critérios para comparação entre Substâncias, Diluições, Tempos e LPS.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	P
Substância	3	36256,44	32	1933,52	18,75	<0,001*
Diluição	1	6123,06	32	1933,52	3,17	0,085 ns
Tempo	1	13205,84	32	1933,52	6,83	0,014 *
LPS	1	38416,00	32	1933,52	19,87	<0,001*
Subs. X Dil.	3	14987,95	32	1933,52	7,75	<0,001*
Subs. X Tempo	3	9408,42	32	1933,52	4,87	0,007 *
Dil. X Tempo	1	4096,00	32	1933,52	2,12	0,155 ns
Subs. X LPS	3	8034,48	32	1933,52	4,16	0,014 *
Dil. X LPS	1	663,06	32	1933,52	0,34	0,562 ns
Tempo X LPS	1	24885,06	32	1933,52	12,87	0,001
Subs. X Dil. X Tempo	3	2787,90	32	1933,52	1,44	0,249 ns
Subs. X Dil. X LPS	3	3107,74	32	1933,52	1,61	0,207 ns
Subs. X Tempo X LPS	3	3601,87	32	1933,52	1,86	0,156 ns
Dil. X Tempo X LPS	1	351,56	32	1933,52	0,18	0,673 ns
Subs. X Dil. X Tempo X LPS	3	868,65	32	1933,52	0,45	0,720 ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.19 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey.

Grupo	Média
CLX A 48h COM	-25,50 a
CLX A 24h SEM	4,00 a b
CLX A 24h COM	5,00 a b
CLX A 48h SEM	11,67 a b
Endoquil A 24h SEM	31,50 a b c
CLX B 24h SEM	31,50 a b c
Endoquil A 24h COM	35,00 a b c
Endoquil A 48h COM	39,50 a b c
Endoquil B 24h SEM	45,50 a b c
Endoquil A 48h SEM	46,17 a b c
Endoquil B 24h COM	49,75 a b c
Endoquil B 48h COM	62,50 a b c
NaOCL B 24h SEM	66,00 a b c
NaOCL A 48h SEM	71,75 a b c
Endoquil B 48h SEM	75,33 a b c
Controle B 24h SEM	80,75 a b c
Controle A 24h SEM	80,75 a b c
Controle B 48h SEM	84,50 a b c
Controle A 48h SEM	84,50 a b c
NaOCL B 48h SEM	93,50 a b c
CLX B 48h SEM	96,00 a b c
CLX B 48h COM	99,75 a b c
NaOCL A 48h COM	100,50 a b c
NaOCL B 48h COM	101,50 a b c
Controle B 48h COM	130,83 a b c
Controle A 48h COM	130,83 a b c
NaOCL A 24h SEM	137,75 a b c
CLX B 24h COM	176,25 b c d
Controle A 24h COM	183,50 b c d
Controle B 24h COM	183,50 b c d
NaOCL B 24h COM	212,50 c d
NaOCL A 24h COM	339,75 d

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si.

Tabela A.20 – Resultado das comparações múltiplas do Endoquil em 24/48 horas para a TNF- α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 24h com LPS	Ns
Endoquil A 48h sem LPS x Endoquil A 48h com LPS	Ns
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 24h com LPS	Ns
Endoquil B 48h sem LPS x Endoquil B 48h com LPS	Ns
Endoquil A 24h sem LPS x Endoquil A 48h sem LPS	Ns
Endoquil A 24h com LPS x Endoquil A 48h com LPS	Ns
Endoquil B 24h sem LPS x Endoquil B 48h sem LPS	Ns
Endoquil B 24h com LPS x Endoquil B 48h com LPS	Ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.21 – Resultado das comparações múltiplas do NaOCL em 24/48 horas para a TNF- α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 24h com LPS	<0,05*
NaOCL A 48h sem LPS x NaOCL A 48h com LPS	Ns
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 24h com LPS	Ns
NaOCL B 48h sem LPS x NaOCL B 48h com LPS	Ns
NaOCL A 24h sem LPS x NaOCL A 48h sem LPS	ns
NaOCL A 24h com LPS x NaOCL 48h com LPS	<0,05*
NaOCL B 24h sem LPS x NaOCL B 48h sem LPS	ns
NaOCL B 24h com LPS x NaOCL B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.22 – Resultado das comparações múltiplas do Digluconato de Clorexidina em 24/48 horas para a TNF- α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
CLX A 24h sem LPS x CLX A 24h com LPS	ns
CLX A 48h sem LPS x CLX A 48h com LPS	ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 24h com LPS	ns
CLX B 48h sem LPS x CLX B 48h com LPS	ns
CLX A 24h sem LPS x CLX A 48h sem LPS	ns
CLX A 24h com LPS x CLX A 48h com LPS	ns
CLX B 24h sem LPS x CLX B 48h sem LPS	ns
CLX B 24h com LPS x CLX B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

Tabela A.23 – Resultado das comparações múltiplas dos Controles em 24/48 horas para a TNF- α com e sem LPS.

Grupos	Diferença
Controle A 24h sem LPS x Controle A 24h com LPS	ns
Controle A 48h sem LPS x Controle A 48h com LPS	ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 24h com LPS	ns
Controle B 48h sem LPS x Controle B 48h com LPS	ns
Controle A 24h sem LPS x Controle A 48h sem LPS	ns
Controle A 24h com LPS x Controle A 48h com LPS	ns
Controle B 24h sem LPS x Controle B 48h sem LPS	ns
Controle B 24h com LPS x Controle B 48h com LPS	ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

NO

Tabela A.24 – Análise de variância a quatro critérios para comparação entre Substâncias, Diluições, Tempos e LPS.

Efeito	GL Efeito	QM Efeito	GL Erro	QM Erro	F	p
Substância	3	40095,38	32	6671,26	6,01	0,002 *
Diluição	1	91339,16	32	6671,26	13,69	0,001 *
Tempo	1	9247,61	32	6671,26	1,39	0,248 ns
LPS	1	161769,34	32	6671,26	24,25	<0,001*
Subs. X Dil.	3	19403,04	32	6671,26	2,91	0,049 *
Subs. X Tempo	3	14948,14	32	6671,26	2,24	0,103 ns
Dil. X Tempo	1	28,50	32	6671,26	0,00	0,948 ns
Subs. X LPS	3	1499,38	32	6671,26	0,22	0,878 ns
Dil. X LPS	1	26445,29	32	6671,26	3,96	0,055 ns
Tempo X LPS	1	13315,57	32	6671,26	2,00	0,167 ns
Subs. X Dil. X Tempo	3	678,86	32	6671,26	0,10	0,958 ns
Subs. X Dil. X LPS	3	10209,07	32	6671,26	1,53	0,226 ns
Subs. X Tempo X LPS	3	9265,38	32	6671,26	1,39	0,264 ns
Dil. X Tempo X LPS	1	346,71	32	6671,26	0,05	0,821 ns
Subs. X Dil. X Tempo X LPS	3	1268,74	32	6671,26	0,19	0,902 ns

ns - Diferença estatisticamente não significativa

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela A.25 – Resultado das comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, dos fatores Substância e Diluição.

Grupo	Média	
CLX A	13,85	a
NaOCL A	76,95	a b
CLX B	157,53	b c
Endoquil A	177,24	b c
Controle A	186,61	b c
Controle B	186,61	b c
NaOCL B	201,92	b c
Endoquil B	210,82	c

Grupos com a mesma letra não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si.

ANEXO A - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

