LORENA RIBEIRO DE SOUSA

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE (LILT) NA
PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS
POR CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

São Paulo

2006

Lorena Ribeiro de Sousa

Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na produção de proteínas por macrófagos estimulados por cimentos endodônticos

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2006

FOLHA DE AROVAÇÃO

Sousa LR. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na produção de proteínas por macrófagos estimulados por cimentos endodônticos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / /2006

Banca Examinadora

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

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

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

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

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

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

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

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

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

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos **pacientes**, não somente da Odontologia, mas todos de uma forma geral, que possam vir utilizar ou necessitar dos resultados obtidos nesta pesquisa para o tratamento e recuperação de sua saúde. Pois, este trabalho foi elaborado e executado utilizando outras vidas, vidas de animais (camundongos BALB de laboratório) em busca de respostas que possam talvez beneficiá-los de alguma forma na busca de melhorar a saúde, quem sabe uma cura para suas debilidades no corpo e enfim, ajudar assim, a melhorar suas qualidades de vida.

Aos **profissionais cirurgiões - dentistas e das demais áreas de saúde**, que os resultados aqui encontrados também possam elucidar algumas dúvidas e ajudá-los a decidir qual caminho seguir para o tratamento a ser aplicado em seus pacientes.

Aos **colegas pesquisadores da área de saúde**, que este trabalho nos estimule a continuar nossas buscas que visam entender, encontrar e melhorar o atendimento à saúde coletiva.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, princípio fundamental de todas as coisas.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que eu entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”

1 CORÍNTIOS 13:1-7

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, Guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera a minha alma; Guia-me pelas veredas da justiça, por amor do Seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo; a Tua vara e o Teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença de meus inimigos, Unges minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias de minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”

SALMO 23

Aos meus pais, **Saulo e Penha**, que me tornaram o que sou hoje, que me amaram, educaram e me apoiaram em todos os sentidos (moralmente, psicologicamente, fisicamente e, nas atuais circunstâncias, até mesmo financeiramente). Obrigada por acreditarem em mim, por estarem em acordo com as minhas decisões e também por ajudar a decidir quais seriam as melhores para mim. Sem vocês junto de mim, no meu coração e mente, jamais teria chegado aqui. Amo vocês!

À minha irmã **Leticia (Lé)** e meu cunhado **Roberto (Beto)**, pelo carinho, orientação, preocupação e apoio nos meus momentos difíceis nesse período. Vocês foram muito importantes e são peças-chave para que eu viesse até o fim dessa jornada. Com certeza, posso afirmar que sem vocês eu poderia não ter conseguido. Muito obrigada!

Aos meus irmãos, **Liliane (Lilinha)** e **Marcelo**, pela compreensão e ajuda nos meus momentos de dúvida, mesmo distantes, em outros países e cidades. Conseguindo manter presente nossa eterna amizade, demonstrando nosso amor uns pelos outros.

Ao meu noivo, **Fabricio Pires Domingues**, meu amor, meu companheiro, amigo de todas as horas. Entendedor de minhas ausências, angústias e dificuldades desse período. Acompanhando-me, dando sua proteção nos horários da madrugada em que eu precisei comparecer na faculdade para as pesquisas noturnas. Seu amor, caráter e devoção me mantiveram calma, confiante e concentrada para terminar minha busca. Muito Obrigada! Amo você!

Ao meu pai profissional, **Prof. Dr. Edison Vivas de Resende**, meu profundo agradecimento por ter acreditado em mim (mesmo quando eu não era capaz disso), ter me acolhido como *filha* e me encaminhado, me orientado, me preparado para o caminho que buscava seguir. Muito obrigada por nunca ter me abandonado, por ter me dado coragem e instruções para enfrentar minhas dificuldades com muita ética sempre e acima de tudo. Minha eterna admiração pelo seu profissionalismo, devoção ao magistério de ser Professor com P maiúsculo como todos deveriam ser e seguir seu caminho. Seus ensinamentos estão encravados no meu coração e onde quer que eu vá estarão comigo por toda minha carreira e vida. Eterna gratidão!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Márcia Martins Marques** (mãe profissional, apesar não ter idade para realmente ser), muito obrigada por ter me recebido de braços abertos, por me ensinar a ser mais forte, a batalhar por aquilo que acredito e busco. Você é o espelho que procuro não somente como ser Professora, mas, também como pessoa. Tudo que fez por mim desde o início de nossos contatos, foram fatos que jamais uma orientadora, uma amiga ou uma irmã fariam, somente uma mãe mesmo. Receba minha eterna gratidão, admiração e felicidade por Deus ter nos colocado lado a lado para caminharmos juntas.

Ao meu primeiro orientador, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Aun**, por ter me acolhido no início da minha jornada nesta Instituição. Pelos momentos que serviram para meu amadurecimento profissional e moral, muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana**, pela sua dedicação ao Curso de Pós-Graduação em Endodontia, profissionalismo, responsabilidade e bom senso. Por me receber, acolher e me instruir com muita atenção, calma e compreensão. És mais um dos Professores que tanto admiro e tanto tenho a agradecer.

Ao **Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi**, por me indicar o começo do caminho para alcançar o que eu buscava. Muito admiro sua vocação e talento. Grata por suas aulas, conversas e orientações que sempre me acrescentaram vivência e prática.

À **Profa. Dra. Dunnia Del Carmen Rodríguez Soto**, do Instituto de Ciências Biológicas da USP (ICB), pela sua ajuda e participação fundamental em uma das partes práticas desta pesquisa. Muito obrigada por ter dispensado seu tempo para participar junto a mim no momento de obtenção e semeadura dos macrófagos peritoneais.

À **Profa. Mestre Gui Mi Ko**, responsável pela produção e distribuição de animais do biotério da Escola Paulista de Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo, pela cooperação em fornecimento dos camundongos usados neste trabalho e ajuda prática na injeção peritoneal da solução para a peritonite crônica nos mesmos.

Ao amigo **Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**, por me acompanhar de forma geral e também participar comigo na parte prática no preparo das substâncias para o uso dos Kits ELISA e colaboração na parte estatística. Companheiro em muitos outros trabalhos, dedicado e muito profissional. Obrigada, Bruno, por estar ao meu lado.

Às bibliotecárias, **Vânia M B O Funaro e Gláucia E D Fidelis**, pela normalização do trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida nesses anos em que estive matriculada no Curso de Pós-Graduação da Área de Concentração em Endodontia da FOU SP.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio-pesquisa fundamental para execução total para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo dos Santos**, pela oportunidade de ensinamento e crescimento concedida junto ao seu grupo de pesquisa e ensino para minha carreira.

Ao amigo, **Prof. Dr. Evandro Luíz Siqueira**, pela primeira oportunidade real e *abertura de portas* para meu conhecimento e ensinamento profissional na APCD de Osasco. Muito obrigada meu amigo.

Ao **Profs. Drs. Giulio Gavini e Celso Luiz Caldeira**, pelo acolhimento no Curso Avançado da FUNDECTO para aprimoramento de meus conhecimentos na área de Endodontia.

Ao **Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado**, pelo estágio didático sob sua supervisão no Curso de Graduação em Endodontia da UNICSUL, que muito contribuiu para meu conhecimento.

Aos **Profs. Drs. Abílio Albuquerque Maranhão de Moura, Igor Propowitsch e José Luís Lage-Marques, do Curso de Pós-Graduação**, que contribuíram para a minha formação e muito acrescentaram.

Aos meus **vários colegas de pós-graduação**, que por serem muitos em tantos anos é impossível citar o nome de cada um, alguns já se foram, outros acabaram de chegar, espero que não fiquem tristes pela ausência do nome, mas, saibam que estão todos no meu coração. Obrigada pelo companheirismo e amizade nesta jornada.

Aos **funcionários da portaria da FOU SP**, que me acompanharam, protegeram e me alertaram nas noites, feriados e finais de semana em que tive que comparecer para pesquisas na faculdade.

Às **funcionárias do Serviço de Pós-Graduação**, Cátia Tiezzi dos Santos, Alessandra Moreira de Lima e Nair Hatsuko Tanaka Costa, pela cooperação, dedicação e boa orientação nos momentos em que precisei da CPG da FOU SP, muito obrigada.

Aos **funcionários do Departamento de Dentística**, por tantos anos de informação e colaboração.

Aos **meus colegas do Curso de Endodontia da FUNDECTO**, obrigada pela convivência enriquecedora.

Sousa LR. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na produção de proteínas por macrófagos estimulados por cimentos endodônticos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A terapia endodôntica visa o selamento biológico do complexo sistema apical, contribuindo para isso, as substâncias usadas no tratamento e a resposta imune do paciente. A LILT tem mostrado atividade antiinflamatória, favorecendo o processo reparacional. Sendo assim, este trabalho objetivou analisar o efeito da LILT na atividade secretória de macrófagos, previamente ativados por IFN- γ e LPS de *E.coli*, e estimulados por substâncias liberadas de três tipos de cimentos endodônticos, um a base de óxido de zinco e eugenol, outro a base de hidróxido de cálcio e um terceiro resinoso. A citotoxicidade dessas substâncias foi avaliada usando a técnica de análise do MTT. Macrófagos ativados foram estimulados por essas substâncias ou não (controle) e então, irradiados ou não (controle) e a secreção de proteínas pró-inflamatórias (interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α e metaloproteinase da matriz-1) foram analisadas pelo teste ELISA. As irradiações foram realizadas com um laser GaAlAs (780 nm, 70 mW, ponta da fibra de 4 mm², 1.67 seg, 3 J/cm²). Foram usadas duas aplicações de irradiação com intervalo de 6 h. Os dados obtidos foram tratados por Análise de Variância, quando de distribuição normal, ou teste de Friedman, quando de distribuição não normal, com nível de significância de 5 % ($p = 0,05$). A viabilidade dos controles e células tratados pelos cimentos endodônticos foi similar. Produção de IL-1 β e TNF- α foram observadas. Houve alta produção de MMP-1. Entretanto, sem diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Os grupos irradiados apresentaram resultados similares aos não irradiados. Substâncias liberadas pelos

cimentos endodônticos testados não se mostraram citotóxicas nas condições deste experimento. Essas substâncias, bem como a LILT, no parâmetro utilizado, não causam alteração na atividade de secreção de MMP-1, IL-1 β e TNF- α por macrófagos ativados.

.

Palavras-Chave: Cimentos Endodônticos; IL-1 β ; IFN- γ ; LILT; LPS; Macrófagos; MMP-1; TNF- α .

Sousa LR. Effect of low level laser therapy (LILT) on the protein secretion by endodontic sealers stimulated macrophages [Tese de Doutorado]. São Paulo: School of Dentistry; 2006.

ABSTRACT

The endodontic therapy seeks the dental root canal biological sealing, depending on substances used in this process and patient's defense immune factors. LILT has shown an anti-inflammatory activity, improving the periapical repair process. This *in vitro* study aimed to analyze the effect of LILT at the secretory activity of macrophages previously activated by interferon-gamma and lipopolysaccharide from *E.coli*, and stimulated by substances leached from three endodontic sealers (zinc oxide-eugenol based, resinous and calcium hydroxide-based). Cytotoxicity of these substances was assessed by the MTT test. Activated macrophages were stimulated by the substances or not (control) and then, irradiated or not (control) and the secretion of pro-inflammatory proteins (interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-1) was analyzed by ELISA test. The LILT was performed using a GaAlAs laser (780 nm, 70 mW, focal spot of 4.0 mm², 1.67 sec, 3 J/cm²). Two irradiations with 6 h-intervals were done. The data was compared by either ANOVA test or Friedman's test. The cell viabilities of controls and cells treated by the sealers were similar. Production of IL-1 β and TNF- α were observed. There was a high production of MMP-1. However, statistical differences were not observed amongst the groups. The irradiated groups presented results similar to those of non irradiated groups. Substances leached from the endodontic sealers are non cytotoxic at these experiments conditions. These substances, as well as the LILT, at

the parameter used, were not able to change the secretion of MMP-1, IL-1 β e TNF- α by activated macrophages.

Key words: LILT; endodontic sealers; Macrophages , MMP-1 IL-1 β , TNF- α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Coloração May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld (DI FIORI, 1991).....	40
Figura 4.1 - Distribuição do plaqueamento das células e das fileiras de calibragem para análise da respiração mitocondrial.....	67
Figura 4.2 - Aspecto dos poços após adição de 10 µL do reagente A	68
Figura 4.3 - Aspecto dos poços após adição de 100 µL do reagente B	68
Figura 4.4 - Aspecto dos poços após o final do experimento, no momento da leitura em espectrofotômetro.....	69
Figura 4.5 - Leitura da absorbância no espectrofotômetro ELISA.....	69
Figura 4.6 - Distribuição das células semeadas em 12 poços das placas de 96 poços.....	71
Figura 4.7 - Suporte desenvolvido para aplicação padronizada do laser nos poços (Capela de fluxo laminar com suporte para a irradiação do laser e placa pronta para ser irradiada).....	74

Figura 4.8 - Detalhe da ponta padrão 4 mm ² fixada ao suporte na posição horizontal para total paralelismo e contato com o fundo dos poços.....	75
Figura 4.9 - Placa com cobertura, já com a monocamada ao fundo do poço, indicando local padronizado.....	76
Figura 4.10 - Demonstração do feixe irradiado na tela com perfuração padronizada....	76
Figura 5.1 - Identificação das células obtidas do líquido de ascite dos camundongos. (May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld; X 400).....	88
Figura 5.2 - Médias de viabilidade celular dos macrófagos tratados pelas substâncias liberadas por cimentos endodônticos nos períodos de 1 e 24 h de condicionamento do meio de cultura celular. As barras correspondem aos erros padrões das médias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).....	90
Figura 5.3 - Médias das concentrações de MMP-1, nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias.....	93

Figura 5.4 - Médias das concentração de TNF- α , nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias.....92

Figura 5.5 - Médias das concentração de IL-1 β , nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias.....94

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Composição do Pulp Canal Sealer EWT.....	60
Quadro 4.2 - Composição do Sealapex.....	61
Quadro 4.3 - Composição do AH-Plus.....	62
Quadro 4.4 - Especificações do fabricante do Twin Laser.....	73
Quadro 4.5 - Parâmetros utilizados nas culturas celulares que foram irradiadas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Teste de Friedman para análise MTT.....89

Tabela 5.2 - Análise de Variância da produção e quantificação de MMP-1.....91

Tabela 5.3 - Teste de Friedman para produção de TNF - α93

Tabela 5.4 - Teste de Friedman para produção de IL-1 β94

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Dados originais da citotoxicidade dos cimentos em 1 e 24 horas.....	121
Apêndice B – Dados originais da produção e quantificação de MMP-1 em ng/mL.....	121
Apêndice C – Dados originais da produção e quantificação de TNF- α em pg/mL.....	122
Apêndice D – Dados originais da produção e quantificação de IL-1 β em pg/mL.....	122
Apêndice E – Estatística descritiva da citotoxicidade dos cimentos em 1 e 24 horas..	123
Apêndice F – Estatística descritiva da produção e quantificação de MMP-1.....	124
Apêndice G – Estatística descritiva da produção e quantificação de TNF- α	125
Apêndice H – Estatística descritiva da produção e quantificação de IL-1 β	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APMA	acetato de p-aminofenilmercúrio
células B	células derivadas do baço
células NK	células <i>natural killer</i>
células T	células derivadas do timo
células T CD4 ⁺	células T do tipo CD4 ⁺
células Th1, 2	células T <i>helper</i> do tipo 1 e 2
células Th 2	células T <i>helper</i> do tipo 2
Con A	conavalina A
CO ₂	dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EWT	<i>extended work time</i>
FcγR	<i>fraction c gamma-recept</i>
h	hora
HCl	ácido clorídrico
GM-CSF	<i>grouping macrophage- colony stimulator factor</i>
IFN-α/β	interferon-alfa/beta
IFN-γ	interferon-gama
IL-1	interleucina-1

IL-2	interleucina-2
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IL-12	interleucina-12
IL-1 α	interleucina-1 alfa
IL-1 β	interleucina-1 beta
ISO	<i>International Standard Organization</i>
K ⁺	íon potássio
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
LILT	<i>low intensity laser therapy</i>
linfócitos B	linfócitos de origem do baço
linfócitos T	linfócitos de origem do timo
LPS	lipopolissacarídeo
M	molaridade
MCA	Meio condicionado com AH-Plus
MCAi	Meio condicionado com AH-Plus e irradiação
MCS	Meio condicionado com Sealapex
MCSi	Meio condicionado com Sealapex e irradiação
MCP	Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT
MCPi	Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT e irradiação

MDF	Meio DME fresco e irradiação (controle 2)
MDFi	Meio DME fresco e irradiação (controle 1)
µg	micrograma
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mm	milímetro
MMPs	metaloproteinases da matriz
MMP-1	metaloproteinase da matriz -1
MMP-3	metaloproteinase da matriz -3
MMP-7	metaloproteinase da matriz-7
MMP-8	metaloproteinase da matriz-8
MMP-9 11	metaloproteinase da matriz-9
MMP-10	metaloproteinase da matriz-10
MMP-11	metaloproteinase da matriz-11
MMP-12	metaloproteinase da matriz-12
MMP-13	metaloproteinase da matriz-13
MMP-14	metaloproteinase da matriz-14
MMP-25	metaloproteinase da matriz-25
µm	micrômetro
MTT	brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio
mW	miliwatt
n	número

ng	nanograma
nm	nanômetro
p	probabilidade
PBSA	solução tampão fosfato de sódio sem cálcio e magnésio
pg	picograma
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	<i>standard error of media</i>
streptavidina-HRP	streptavidina <i>horse rarish peroxidase</i>
TIMP-1,2	<i>tecidual inhibitor of metalloproteinase-1,2</i>
TMB	3.3', 5.5 - tetramethylbenzidine
TNF-a	<i>tummor necrosis factor-alfa</i>
U	unidade
VDPC	<i>voltage dependent potassium channels</i>
°C	graus Celsius
±	mais ou menos
=	menor ou igual
%	por cento

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	31
2.1 Cimentos Endodônticos.....	32
2.1.1 Cimentos à base de óxido de zinco e eugenol.....	32
2.1.2 Cimentos à base de resina.....	34
2.1.3 Cimentos à base de hidróxido de cálcio.....	35
2.2 Inflamação Crônica.....	36
2.2.1 Macrófagos.....	37
2.2.1.1 <i>Macrófagos ativados</i>	41
2.2.1.a <i>Interferon-gama (IFN-g)</i>	44
2.2.1.b <i>Lipopolissacarídeo (LPS)</i>	46
2.2.2 Citocinas.....	47
2.2.2 a <i>Interleucina-1β (IL-1β)</i>	48
2.2.2 b <i>Fator de Necrose Tumoral - α (TNF-α)</i>	49
2.2.3 Metaloproteinase da matriz (MMPs).....	50
2.2.3 a <i>Metaloproteínas da matriz -1 (MMP-1)</i>	51

2.3 Tratamento com Laser em Baixa Intensidade (LILT).....	52
3 PROPOSIÇÃO	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Preparo dos cimentos.....	60
4.2 Condicionamento do meio de cultivo celular pelos cimentos.....	63
4.3 Obtenção dos macrófagos.....	64
4.4 Análise da citotoxicidade de substâncias liberadas por cimentos endodônticos.....	65
4.5 Ativação clássica dos macrófagos.....	70
4.6 Irradiação laser	72
4.7 Detecção das enzimas pelo método ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	77
4.7.1 Instruções para detecção e quantificação da MMP-1.....	78
4.7.2 Instruções para detecção e quantificação das citocinas TNF- α e IL-1 β	82
4.8 Análise estatística.....	86
5 RESULTADOS.....	87
5.1 Identificação dos macrófagos peritoneais.....	88
5.2 Análise da citotoxicidade dos cimentos endodônticos.....	89
5.3 Análise de produção e quantificação de MMP-1.....	90
5.4 Análise de produção e quantificação de TNF- α	92
5.5 Análise de produção e quantificação de IL-1 β	93

6 DISCUSSÃO.....	95
7 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES	120
ANEXO.....	127

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico busca restabelecer as condições de normalidade dos dentes pela eliminação de microrganismos e seus produtos, remoção de tecido lesado, sanificação e obturação do sistema de canais radiculares (LEONARDO, 2005).

O selamento apical biológico objetivado pela Endodontia, com auxílio, dentre outros, dos materiais obturadores tanto à base de óxido de zinco e eugenol quanto de epóxi-resina ou de hidróxido de cálcio nem sempre é conseguido com sucesso. Isso porque, a regeneração dos tecidos periapicais e a sintomatologia pós-operatória apresentada pelo paciente depende da resposta inflamatória do periodonto apical, em função do tratamento, cabendo considerar ainda, a citotoxicidade dos materiais utilizados (LEONARDO, 2005).

A inflamação é uma reação local dos tecidos à agressão que ocorre como resposta inespecífica do hospedeiro na tentativa de limitar o dano e buscar a cura. Nas reações inflamatórias, existe a participação de componentes celulares, que são importantes na defesa ou na destruição dos tecidos, como por exemplo, os macrófagos (METZGER, 2000; TAYLOR et al., 2005). Esses, quando ativados pela reação inflamatória, secretam tanto enzimas proteolíticas quanto inibidores de proteases, outras citocinas, alguns mediadores químicos e radicais livres. As substâncias liberadas pelos macrófagos podem ser responsáveis, tanto pela manutenção quanto, pela resolução do quadro inflamatório. Entre essas substâncias destacamos a interleucina-1 β (IL-1 β), o

fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) (LARSEN; HENSON, 1983; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; STASHENKO, 1990; TROWBRIDGE; EMLING, 1997; VICENTE et al., 2003).

A intensidade e a evolução do processo inflamatório podem ser determinadas por vários fatores que se relacionam, tais como: o tipo do agente agressor, o tecido onde o processo está instalado e as condições gerais do hospedeiro. Uma maneira de controlar a inflamação e diminuir a presença da sintomatologia dolorosa pós-operatória, favorecendo a cura, tem sido obtida pela terapia com laser em baixa intensidade (EDUARDO; GOUW-SOARES, 2001; GOUW-SOARES et al., 2001; HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005; WALSH, 1997).

Apesar da existência de estudos clínicos mostrando o efeito antiinflamatório da terapia com laser em baixa intensidade, seu mecanismo de ação no processo inflamatório ainda não foi totalmente esclarecido (NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001), em especial no que diz respeito à reação dos tecidos periapicais após obturação dos canais radiculares.

Quando da obturação dos canais radiculares, células inflamatórias, em especial os macrófagos, presentes no periápice, que já haviam sido ativados pelas substâncias liberadas por bactérias e fibroblastos (exemplos: LPS e IFN- γ) também sofrem os efeitos de substâncias liberadas durante a presa dos cimentos endodônticos. São essas células, submetidas a essas condições, que são irradiadas durante a LILT quando realizada imediatamente após a obturação e, poderão ou não ser responsáveis pelo efeito antiinflamatório dessa terapia. Portanto, se justifica a pesquisa inicialmente *in vitro* dos efeitos da LILT sobre macrófagos submetidos às condições descritas acima.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cimentos endodônticos

Nas fases operatórias do tratamento endodôntico, o preparo biomecânico e a obturação do sistema de canais radiculares, são fundamentais para o sucesso dessa terapia. A completa indução do selamento apical por meio de tecido mineralizado ou mesmo por tecido fibroso, mantém relações com as fases operatórias do tratamento dos canais radiculares, principalmente em função do tipo de cimento endodôntico utilizado que, juntamente com a guta-percha, permanecerá em contato com a região periapical (LEONARDO, 2005).

2.1.1 Cimentos à base de óxido de zinco e eugenol

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são utilizados em Endodontia desde os meados dos anos 30. São compostos por esses dois componentes freqüentemente associados a outras substâncias que visam melhorar suas propriedades biológicas e físico-químicas (LEONARDO, 2005).

Sobre cimentos endodônticos que têm por base o óxido de zinco e eugenol recai a preferência dos cirurgiões-dentistas. Caracterizam-se pela facilidade de trabalho, boa adaptação, citotoxicidade e custos baixos, ficando, entretanto, suas propriedades físico-químicas e biológicas na dependência da proporção pó - líquido com que são manipulados (LEONARDO, 2005).

Entre as marcas comerciais de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol destacamos o Pulp Canal Sealer (Keer, Romulus, Michigan, EUA) cuja formulação original, após modificação, recebeu o nome de Pulp Canal Sealer Extended Work Time (EWT). Na comparação da capacidade de microinfiltrações entre esses cimentos Dagher, Yared e Matchou (1997), não constatarem nenhuma diferença entre as formulações apesar do EWT oferecer maior tempo de trabalho. Ainda em relação à infiltração, De Deus et al. (2002), avaliaram a penetração intratubular do Pulp Canal Sealer comparando-o com Endofill, Sealapex e AH-Plus. Como resultado, encontraram maior capacidade de penetração nos túbulos dentinários pelo cimento Pulp Canal Sealer e a pior penetração no grupo do cimento Sealapex. Ainda em relação à infiltração apical o mesmo resultado foi encontrado por Pommel et al. (2003), quando avaliaram o cimento obturador Pulp Canal Sealer comparando-o com os cimentos endodônticos Sealapex, AH-26 e Ketac-Endo.

Quanto a propriedade bactericida o Pulp Canal Sealer EWT mostrou a mesma capacidade antimicrobiana tanto em 24 h quanto em 7 dias, enquanto que o cimento Sealapex mostrou-se melhor apenas às 24 h. O maior efeito bactericida foi apresentado pelo AH-26, não demonstrando o cimento Ketac-Endo nenhum (HELING; CHANDLER, 1996). Siqueira Jr et al. (2000), não verificaram diferenças nas atividades bactericidas dos cimentos Pulp Canal Sealer EWT, Cimento de Grossman, ThermaSeal, Sealer 26,

AH-Plus e Sealer Plus. Na mesma pesquisa, observaram que os cimentos Pulp Canal Sealer EWT e AH-Plus apresentaram melhor escoamento do que os demais, fato condutor à maior efetividade bactericida, consideradas as peculiaridades do sistema de canais radiculares.

Embora tenham muitas das propriedades físico-químicas esperadas de um selador endodôntico, o cimento Pulp Canal Sealer EWT é bastante criticado por conter prata precipitada em sua formulação, podendo alterar cromaticamente a estrutura dental e ainda pela presença de eugenol que pode interferir no processo de reparação por cerca de 10 anos, dada sua ação irritante tecidual (LEONARDO, 2005).

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol alteram a capacidade de adesão de macrófagos peritoneais (MENDES et al., 2003; SADEGHEIN; BOLHARI; SARAFNEJAD, 2001), mas não alteram a viabilidade dessas células quando em estado ativado e nem quando o cimento foi recentemente manipulado ou após 24 horas de sua manipulação (MENDES et al., 2003).

2.1.2 Cimentos à base de resina

Cimentos à base de resina plástica constituem combinação macromolecular sintética do grupo de resinas epóxicas. Sua escolha pelos profissionais geralmente se dá por sua excelência em adesividade à dentina, derivando disso satisfatório selamento marginal da obturação radicular (LEONARDO, 2005).

Um dos representantes desse cimento de maior escolha e uso pelos cirurgiões-dentistas é o AH-Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Swiss, distribuído por Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil), sendo apresentado sob forma de duas pastas (LEONARDO, 2005). O selamento marginal que oferece, quando comparado ao AH-26, que é também um cimento com base na mesma resina, não se mostrou melhor (ZMENER et al., 1997), mas em relação ao Sealer 26 e ao Endofill (KOPPER et al., 2003), ao EndoRez (SEVIMAY; KALAYCI, 2005), ao Pulp Canal Sealer EWT, e ao Sealapex (XU et al., 2005) sim, tendo no estudo de Whitworth; Baco (2005) o Roekoseal apresentado menor grau de infiltração do que ele.

Com relação à atividade antimicrobiana, o cimento AH-Plus é bactericida *in vitro* a várias espécies com poucas exceções (LEONARDO et al., 2000).

Em termos de biocompatibilidade o AH-Plus não se mostrou citotóxico a fibroblastos de ratos da linhagem NIH-3T3 (SCHWARZE et al., 2002) e a fibroblastos de polpa humana (SOUSA; CAVALCANTI; MARQUES, 2005), porém apresentou citotoxicidade em outra pesquisa de Sousa et al. (2004), quando usaram a metodologia de lamínulas com cimento em contato direto com as células, por outro lado mostrou-se indutor da formação de tecido duro na região apical de dentes de cães (LEONARDO et al., 1999).

2.1.3 Cimentos à base de hidróxido de cálcio

A idealização de cimentos à base de hidróxido de cálcio objetivou reunir em um mesmo cimento endodôntico as propriedades biológicas do hidróxido de cálcio em associação às propriedades físico-químicas esperadas por parte de um bom selador do sistema de canais radiculares (LEONARDO, 2005).

Os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentam melhor selamento quando comparados aos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (FACER; WALTON, 2003; SIQUEIRA JR; FRAGA; GARCIA, 1995).

Sua representação comercial, denominada Sealapex (Keer Romulus, Michigan, EUA) é composta por duas pastas que devem ser manipuladas em partes iguais, por 1 a 2 minutos até que se obtenha mistura de cor homogênea e consistência compatível com a aplicação clínica (LEONARDO, 2005). Contribui para melhor reparo biológico quando confrontado com o hidróxido de cálcio puro (SONAT; DALAT; GÜNHAN, 1990), com CRCS, Sealer 26 e Apexit (LEONARDO et al., 1997), com AH-Plus (BERBERT et al., 2002; LEONARDO et al., 2003) e com Sealer Plus (LEONARDO et al., 2003).

Pesquisas sobre citotoxicidade mostraram que o Sealapex não aumenta a liberação de prostaglandinas por fibroblastos de gengiva humana (WILLERSHAUSEN et al., 2000), mas possui alta citotoxicidade sobre macrófagos usando o método de análise de alteração morfológica (LEONARDO et al., 2000), e sobre fibroblastos L 929 em análise de atividade mitocondrial (CAMPS; ABOUT, 2003). Entretanto, induz menor secreção de TNF- α por macrófagos quando comparado com um cimento à base de óxido de zinco e eugenol (PERASSI et al., 2004).

2.2 Inflamação Crônica

Inflamação é uma reação de defesa do hospedeiro frente a um estímulo causador de injúria ao organismo. Independente da natureza desse estímulo, as seqüências de eventos para sanar o processo inflamatório passam por localizar o agente patogênico, isolá-lo e destruí-lo. Para melhor compreensão desse processo é feita uma distinção entre inflamação aguda e crônica (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Denomina-se inflamação crônica, aquela que permanece por mais de dois dias, podendo durar semanas, meses ou anos. A inflamação crônica não necessita obrigatoriamente passar pela fase de inflamação aguda, isso depende da natureza do estímulo ou do potencial do estímulo envolvido. Assim, por exemplo, isso pode ocorrer quando um agente infeccioso possui baixa toxicidade sendo incapaz de provocar uma inflamação aguda perceptível (LARSEN; HENSON; 1983; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Diante de uma patologia pulpar decorre a tendência dos tecidos da região periapical reagirem à agressão inflamando-se. Essa reação pode sofrer intensificação quando da aplicação de procedimentos endodônticos, principalmente os do preparo biomecânico (LEONARDO, 2005; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). Na complementação do tratamento endodôntico cimentos obturadores entram em contato com os tecidos do periápice, condição propícia ao manter da inflamação sob forma crônica localizada (GURGEL FILHO, 2003; NASSRI; LIA; BOMBANA, 2003).

Isso faz com que ocorra ativação da população celular local provocando proliferação de fibroblastos acompanhada da presença de linfócitos, células

plasmáticas e, principalmente, macrófagos (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

2.2.1 Macrófagos

Na medula óssea o precursor dessa linhagem de células se diferencia em monoblasto, que passa depois a ser pró-monócito, e que mais tarde se divide ativamente dando origem ao monócito. Os monócitos são liberados da medula para a circulação sangüínea, constituindo 3 a 5 % de todos os leucócitos circulantes. Na circulação, o monócito tem vida média de 1 a 3 dias, quando segue então para os tecidos se transformando em macrófago (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Os macrófagos são células consideradas plásticas, pois, dependendo do ambiente tecidual, sofrem alterações morfofuncionais e recebem diferentes denominações. No homem adulto, são encontrados na lâmina própria do intestino delgado e fígado recebendo denominação de células de Kupfer, nos pulmões são macrófagos alveolares ou intersticiais, já no baço, linfonodos, e na medula óssea e no sistema nervoso são as microglias. Também são denominados de células de Langerhans quando na pele, de osteoclastos nos ossos, e histiócitos no tecido conjuntivo. São encontrados também em glândulas mamárias, espaços alveolares e nas cavidades pleural, sinovial e peritoneal. Quando se acumulam em sítios inflamatórios crônicos têm a habilidade de diferenciarem-se em células epitelióides ou, ainda, fundirem-se formando células gigantes multinucleadas (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Por estarem presentes de forma bem distribuída pelo organismo e pela sua plasticidade, os macrófagos participam de vários processos no corpo, sendo essencial na imunidade natural (NASCIMENTO, 2000). Essas células do sistema imune são responsáveis pela remoção de células mortas e seus produtos, fagocitose e desbridamento, removendo tecidos danificados, pela ingestão e processamento de antígenos para reconhecimento dos linfócitos, pela liberação de produtos ativadores ou co-estimulatórios para outras células como, linfócitos T e B, e, para os próprios macrófagos, e são a primeira linha de defesa contra certos microrganismos (ex: *Mycobacterium tuberculosis*) (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Para se fazer o reconhecimento dos macrófagos em esfregaço, pode-se usar a coloração de May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Os eosinatos de azul e de azul-de-metileno coram os basófilos, acidófilos, neutrófilos e azurófilos das células tornando fácil o seu reconhecimento. Nos macrófagos ou monócitos coram a cromatina do núcleo oval ou arredondado (chanfrado ou fendido) de violeta avermelhado de acordo com sua textura e deixam o citoplasma, que é um pouco basofílico e com muitas granulações azurófilas, de cor púrpura brilhante (DI FIORI, 1991) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Coloração May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld (DI FIORI, 1991)

2.2.1.1 Macrófagos ativados

A maioria dos macrófagos encontra-se em um estágio basal de atividade e são denominados macrófagos residentes. No entanto, macrófagos obtidos em sítios inflamatórios ou infecciosos, como, por exemplo, em lesões periapicais endodônticas (AKAMINE et al., 1994; HAMACHI et al., 1995; METZGER, 2000; STASHENKO, 1990; SUZUKI; OKIJI; SUDA, 1999; WANG; TANI-ISHII; STASHENKO, 1997), apresentam alterações morfofuncionais típicas de um estado ativado. Para tal, o macrófago é inicialmente estimulado por IFN- γ produzido por células T CD4⁺ ativadas e depois pode ser ativado por endotoxinas bacterianas ou outros tipos de mediadores químicos (MOSSER, 2003; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Hoje se sabe que o macrófago ativado sofre uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais, entendendo-se ainda, que o mais importante é o tipo de ativação da célula, pois vai influenciar seu comportamento, suas alterações e nos produtos que secretará no sítio inflamatório (CAILHIER et al., 2005; DALEY et al., 2005; MOSSER, 2003; TAYLOR et al., 2005).

Autores pesquisaram diferentes formas de ativação e quais os produtos resultantes das diferentes ativações. Shnyra et al. (1998) procuraram a ativação de macrófagos usando um pré-tratamento com LPS puro ou em associação posterior com recombinantes de IFN- γ , IL-10 ou IL-12. Comprovaram que as amostras com os recombinantes e não somente com o IFN- γ foram capazes de produção de TNF- α , IL-10, IL-12 e óxido nítrico.

Brewington et al. (2001) descreveram um método parecido para a ativação de macrófagos usando o pré-tratamento com LPS em combinação posterior com IL-10 ou IL-12, mas, não utilizando doses dependentes de IFN- γ . Apesar da quantidade atenuada encontrada, o novo método foi capaz também de comprovar que as amostras com IL-12 foram capazes de produzir TNF- α , IFN- γ , mas não conseguiram produzir óxido nítrico, assim como as amostras usando IL-10.

Vicente et al. (2003) usaram como ativador para os macrófagos, canais de K⁺ voltagem-dependentes (VDPC), já que esses estão expressos na maioria das células de mamíferos e estão envolvidos na proliferação e ativação de linfócitos. Os autores mostraram que dessa forma de ativação dos macrófagos, eles não somente foram capazes de aumentar o volume celular como aumentaram significativamente a produção de óxido nítrico.

Em busca de um novo método para captar presença ou não e quantificar o IFN- γ liberado por macrófagos ativados, Malu et al. (2003), utilizaram-se da quantificação de óxido nítrico presente nas amostras usando a leitura do espectrofotômetro ELISA. Como resultado conseguiram descrever um método altamente sensível e menos extenso para detecção de IFN- γ bioativo, já que um dos produtos liberados pelos macrófagos com IFN- γ é justamente o óxido nítrico.

Mosser (2003) descreveu as muitas faces da ativação de macrófagos, e cita a mais antiga e conhecida de todas as ativações como *ativação clássica*, aquela em que o macrófago é inicialmente ativado por IFN- γ e depois sua ativação é finalizada com LPS (endotoxina bacteriana). Nesse tipo de ativação o principal papel do macrófago é o de efetivar a resposta imunológica de células T *helper* do tipo 1 (Th1) e é comumente

utilizada por autores (LLOVERA et al., 2001; RODRÍGUEZ et al., 2003). O outro tipo de ativação possível é denominado como *macrófago ativado alternativamente*. Nessa condição a célula é estimulada com um mediador químico, a IL-4, apresentando um fenótipo e produtos diferentes daqueles produzidos pela ativação clássica e seu papel parece estar envolvido com a imunossupressão e reparação tecidual. Já a mais nova alternativa de ativação descrita como *macrófago ativado do tipo II*, em que a ativação ocorre pela ligação do macrófago ativado classicamente com o receptor de Fc para a imunoglobulina G (FcγR) II, interrompe a produção de IL-12 e inicia uma grande produção de IL-10. Assim o macrófago ativado do tipo II tem caráter antiinflamatório e preferencialmente induz resposta imuno-humoral contra antígenos nas células T *helper* do tipo 2 (Th2) (MOSSER, 2003).

Recentemente, Takagi et al. (2005) apresentaram uma ativação de macrófagos mediada por IFN-γ e pamidronato (segunda geração de medicamento à base de aminobisfosfonados usados em tratamento de osteoporose, hipercalcemia entre outros), encontrando como resultado produção significativamente maior de TNF-α de tal forma a sugerirem que essa modulação da citocina poderá ser uma estratégia útil para tratamento de câncer.

As alterações mais comuns encontradas nos macrófagos ativados são:

- aumento do volume celular;
- aumento do número de mitocôndrias, do consumo de oxigênio e metabolismo;
- apresentar forma irregular e inúmeras vilosidades;
- aumento do número de lisossomas e conteúdo enzimático;
- aumento da síntese protéica;

- aumento da atividade fagocitária e liberação de radicais oxigenados;
- aumento da atividade microbicida e tumoricida;

Suas secreções mais comuns são:

- óxido nítrico;
- componentes do sistema complemento;
- prostaglandinas e leucotrienos;
- ativadores plaminogênicos;
- citocinas (IL-1, IL-12, TNF- α entre outras);
- fibronectina;
- metaloproteinases da matriz;
- interferons.

2.2.1.a Interferon-gama (IFN- γ)

Interferons são citocinas que desempenham complexo e importante papel na resistência imunológica do hospedeiro contra patógenos. O IFN- γ é uma citocina secretada por células derivadas do timo (células T) sob certas condições de ativação, macrófagos e também por células *natural killer* (NK) (BOEHM et al., 1997; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). As células T e NK contribuem para o aumento da defesa do hospedeiro. Para otimização da estimulação dessas células Wesley et al. (2005) demonstraram a dependência da aplicação de INF- γ e sua liberação por macrófagos.

Collart et al. (1986) e Nathan et al. (1983) identificaram e comprovaram essa dependente presença e a capacidade do IFN- γ para ativar macrófagos fazendo-os liberar IL-1 β e TNF- α , aumentando assim, a atividade microbida independente da origem do IFN- γ , seja secretado por linfócitos humanos não purificados ou parcialmente purificados ou IFN- γ puros produzidos por bactérias contendo gene humano. Apesar de que Rodrigues et al. (2003), conseguiram ativação de macrófagos sem a presença de IFN- γ , usando apenas uma espécie das lectinas, Con A para oxidação de melatonina por macrófagos.

O IFN- γ possui propriedades de regulação nos aspectos gerais da resposta imune, estimulação de atividade bactericida em fagócitos, estimulação da apresentação do antígeno através do principal complexo molecular de histocompatibilidade das classes I e II, interação de leucócitos com o endotélio, além de efeitos de proliferação celular, assim como, apoptose e também estimulação e repressão de uma variedade de genes cuja função ainda continua obscura. O IFN- γ é auto regulado por interação com respostas de outras citocinas incluindo IFN- α/β , TNF- α e IL-4. Mais de 200 genes são reconhecidamente regulados pelo IFN- γ e estão listados no documento da *World Wide Web* que acompanha a revisão de literatura de Boehm et al. (1997).

Em trabalhos com ativação de macrófagos, a dosagem de IFN- γ utilizada é extremamente variável. Apresentam quantidade de 50 U/mL por 24 hr (LLOVERA et al., 2001), diluições seriadas como 1×10^6 U/mL, 1×10^7 U/mL e 6×10^5 U/mL por 48 horas (NATHAN et al., 1983), onde U é equivalente a 1 ng/mL, 10 μ g/mL entre 2 e 4 horas (COLLART et al., 1986), 20 μ g/mL por 48 horas (NASCIMENTO, 2000) e 50 μ g/mL por 6 horas de exposição sobre macrófagos em cultura celular (TAKAGI et al., 2005). O

volume e o período de incubação em contato com os macrófagos são variados também de acordo com o tamanho das placas de culturas, apresentando-se maiores dosagens quando as áreas das placas de culturas são maiores.

2.2.1.b Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é um componente externo da membrana de bactérias Gram-negativas e é um potente ativador de monócitos e macrófagos (SHNYRA et al., 1998). Subseqüente à sua liberação no sítio infeccioso há a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, TNF e IL-6) e recrutamento dos metabólitos do mecanismo do ácido aracdônico com ativação de outros leucócitos para lutarem contra a infecção (AMURA et al., 1997; CUSCHIERI et al., 2004; WILLIAMS; RIDLEY, 2000).

Altas dosagens de LPS são a maior causa de choque por septicemia, no qual o LPS induz numerosas mudanças, incluindo alta injúria endotelial com adesão leucocitária em células endoteliais e geração de altas dosagens de radicais livres. Essas dosagens de mediadores inflamatórios recrutados prejudicam o hospedeiro, contribuindo para inflamação sistêmica, dano tecidual generalizado e até a morte do indivíduo (CUSCHIERI et al., 2004; WILLIAMS; RIDLEY, 2000). Baixas dosagens fazem apenas com que ocorra inflamação crônica com possíveis seqüelas para outras doenças, como, por exemplo, periodontite com Gram-negativos persistentes que pode levar a uma doença cardiovascular (WILLIAMS; RIDLEY, 2000).

O volume, a quantidade e o período de contato do LPS utilizados nos trabalhos *in vitro* para ativações de macrófagos são variados, dependem da área das placas usadas nas culturas, do período de incubação e se a ativação vai ser em combinação simultânea com o FN- γ . Quando a ativação ocorre *in vivo* a dosagem encontrada é de 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$ por 48 horas (RODRÍGUEZ et al., 2003; RODRÍGUEZ-SOTO, 2001). Em trabalhos com ativação somente *in vitro* encontra-se quantidades de 0,1 EU/mL por 45 minutos (HONG et al., 2004), 10 ng/mL por 48 horas (NASCIMENTO, 2000), 100 ng/mL por 30 minutos (WILLIAMS; RIDLEY, 2000), 100 ng/mL por 24 horas (VICENTE et al., 2003), 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas (DALEY et al., 2005), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas (LLOVERA et al., 2001), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 6, 12, 24 e 48 horas (COIL; TAM; WATERFIELD, 2004), 15 μL do preparo de 1 mg/mL por 24 horas (PERASSI et al., 2004) ou dosagens seriadas de 0,1 a 10 ng/mL por apenas 6 horas (SHNYRA et al., 1998), de 0,1 ou 100 ng/mL por 18 horas (AMURA et al., 1997), de 0,01-10 ng/mL por 6 horas e de 100 ng/mL por 24 horas (BREWINGTON et al., 2001) e até mesmo de 1-100 ng/mL *in vivo* e de 1-1000 ng/mL de 0 a 12 horas *in vitro* (CUSCHIERI et al., 2004).

2.2.2 Citocinas

Citocinas são produtos polipeptídeos solúveis de células do sistema imunológico. Possuem propriedades de modificar o comportamento de outras células assim como de quem as produz (citocinas reguladoras). Podem induzir diferenciação de células como

as T e B, algumas ganham acesso à circulação sanguínea e produzem efeitos como febre e liberação de neutrófilos da medula óssea. Podem ser fatores de crescimento que promovem proliferação celular de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e, são independentes do antígeno específico que tenha iniciado a resposta imune (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

As citocinas que foram purificadas receberam nomes de interleucinas seguidas de uma numeração, por exemplo: IL-1, mas quando a seqüência do aminoácido é desconhecida, a citocina recebe o nome de acordo com seu efeito biológico, como, por exemplo: TNF- α (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

2.2.2 a Interleucina-1b (IL-1b)

Muitos tipos de citocinas estão presentes em lesões periapicais e desempenham um papel importante na resposta imune do hospedeiro em se tratando principalmente de reabsorção óssea (STASHENKO, 1990).

A IL-1 é um polipeptídeo que em função de sua estrutura tem afinidade aos variados tipos de proteases e pela sua falta de atividade em seguir a modificação covalente dos resíduos da arginina (DURUM; SCHMIDT; OPPENHEIM, 1985). As IL-1 são produzidas principalmente por macrófagos, mas também são secretadas por monócitos e células endoteliais. Como atividades biológicas de uma forma geral pode-se citar que são quimiotáticas para monócitos e neutrófilos, aumentam a proliferação de

fibroblastos, induzem a produção de IL-2, de GM-CSF, de collagenases e prostaglandinas (causando febre, sono, falta de apetite e outras respostas características da inflamação em fase aguda) e aumentam consideravelmente a reabsorção óssea por osteoclastos (LARSEN; HENSON, 1983; TROWBRIDGE; EMLING, 1997; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; STASHENKO, 1990).

A IL-1 β é uma das citocinas que estão presentes nos sítios inflamatórios endodônticos, cerca de 60 % da atividade de reabsorção óssea é atribuída a ela, independente de distúrbios endodônticos sintomáticos ou não, seguida pelo TNF- α e produtos do metabolismo do ácido aracdônico (prostaglandinas) e os sinergismos entre esses. Pode-se dizer que a IL-1 β talvez seja a interleucina mais importante na reabsorção, pois sua produção é 15 vezes maior que a produção de IL-1 α além de 1000 vezes mais potente que o TNF- α (COIL; TAM; WATERFIELD, 2004; HAMACHI et al., 1995; LIM et al., 1994; STASHENKO, 1990; WANG; TANI-ISHII; STASHENKO, 1997).

2.2.2 b Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α)

O TNF foi caracterizado inicialmente como uma citocina de função exclusivamente tumoricida, causando a regressão de determinados tumores. Hoje, sabe-se que o TNF pode participar de uma série de eventos biológicos tais como:

necrose hemorrágica de tumores transplantados, proliferação celular, caquexia e septicemia (TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

O TNF- α foi identificado em pesquisa investigando moléculas mediadoras de caquexia e citotoxicidade tumoral. Agora se sabe ter papel regulador central na inflamação, imunidade e defesa do hospedeiro. O TNF- α pode induzir indiretamente a diferenciação de osteoclastos a partir dos precursores (monócitos do sangue) e, além disso, estimular a produção de IL-1 β , participando assim da reabsorção óssea. Sua presença é considerada a segunda sinalização para ativação de mais macrófagos, e em baixas doses, pode atuar na migração, proliferação de fibroblastos, além da síntese e secreção de colágeno (TROWBRIDGE; EMLING, 1997; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

A rápida produção dessa citocina em resposta à infecção microbiana pode levar a efeitos benéficos locais, mas também a efeitos letais sistêmicos. Sua natural dualidade se deve a citocinas que dividem receptores sistêmicos comuns com o TNF- α ([HTTP://WWW. AMERSHAMBIOSCIENCES.COM](http://www.amershambiosciences.com), 2005). Suas atividades biológicas são praticamente as mesmas citadas para as IL-1 β , com menores potências, além da conhecida citotoxicidade para algumas células neoplásicas (TROWBRIDGE; EMLING, 1997; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

Nas inflamações endodônticas é a segunda citocina encontrada em maior quantidade na região periapical (ATAOGLU et al., 2002; BLETSA et al., 2004; COIL; TAM; WATERFIELD, 2004; STASHENKO, 1990; WANG; TANI-ISHII; STASHENKO, 1997). Sua liberação e quantificação foram investigadas recentemente por Perassi et al. (2004) em razão do possível contato dos cimentos obturadores de canais radiculares

com a região periapical, e quanto os mesmos poderiam influenciar na modulação do TNF- α . Esses autores mostraram que o importante é a citotoxicidade do cimento endodôntico e não a quantidade de cimento à qual o macrófago (produtor de TNF- α) fica exposto.

2.2.3 Metaloproteinase da matriz (MMPs)

As MMPs, conhecidas também como matrixinas, são endopeptíases zinco-dependentes. Possuem habilidade de clivar um ou muitos constituintes da matriz extracelular. Elas constituem uma grande família de proteases que dividem elementos funcionais e estruturais comuns e são produzidas por diferentes genes, expressas por citocinas pró e antiinflamatórias e fatores de crescimento (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997). São enzimas distinguidas de outras classes de proteinases pela dependência de íons de metal e pH neutro para sua atividade (LAGENTE et al., 2005).

As MMPs dependem especificamente do substrato, do aminoácido e da sequência modular identificável para então serem classificadas em: collagenases (MMP-1, 8, e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromalinases (MMP-3, 10 e 11), membranas-tipo MMP (MMP-14 até MMP-25), matrilisinas (MMP-7) e metaloelastases (MMP-12). Essas MMPs são o principal grupo de proteases conhecidas para regular a produção da matriz

extracelular participando assim nos processos inflamatórios com remodelação tecidual (LAGENTE et al., 2005).

2.2.3 a Metaloproteínas da matriz -1 (MMP-1)

A MMP-1 (colagenase tipo fibroblasto intersticial) pode clivar hélices de colágeno tipo 1 em produtos característicos de $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ do tamanho da hélice original. Ela é expressa em fibroblastos, macrófagos, condrócitos, em certas células tumorais e está implicada em muitos processos de curas de doenças ([HTTP://WWW.AMERSHMBIOSCIENCES.COM](http://www.amershmbiosciences.com), 2005).

Na Implantodontia (NOMURA et al., 2000), Periodontia (EJEIL et al., 2003; TÜTER; KURTIS; SERDAR, 2002) e Ortodontia (INGMAN et al., 2005) a quantidade de MMP-1, assim como a MMP-8, tem sido analisada para saber se sua presença, em alta dosagem ou não, pode influenciar no processo de cura, ou seja, na remodelação óssea da região tratada. Como mostraram nos grupos com altas doses o reparo é menor, a remodelação é mais lenta do que quando da presença de TIMP-1. E em se tratando do TIMP-1, Patruta et al. (2004) mostraram que a estimulação com laser de diodo, *in vitro*, de fibroblastos de gengiva humana aumenta a produção dessa quando comparados com os controles.

Em células da polpa dentária humana, extratos de diferentes tipos de bactérias, foram capazes de aumentar e acelerar a produção de MMP-1 e MMP-2, em contrapartida a produção do TIMP-1 também foi elevada com exceção do TIMP-2 que

teve sua secreção inibida pelos extratos bacterianos (NAKATA et al., 2000). Lin et al. (2002) observaram o aumento da expressão da MMP-1 quando induziram lesões periapicais em ratos e Shin et al. (2002) mensuraram os níveis das MMP-1, 2 e 3 em tecido de polpa humana encontrando como resultado presença de todas em infiltrados de neutrófilos, macrófagos e matriz extracelular do grupo com pulpíte aguda.

2.3 Tratamento com Laser em Baixa Intensidade (LILT)

Tem sido proposto o uso da LILT em processos inflamatórios crônicos ou agudos visando controle sobre a intensidade e evolução do processo, contribuindo assim, por meio da modulação celular, para o alcance de melhorias no reparo (MESTER; YASZSAGI-NAGY, 1973). Esses mecanismos não estão completamente elucidados na literatura. Apesar disso, é sabido que o início das reações à radiação laser se dá na mitocôndria para comprimentos de onda na luz visível e na membrana celular para o infravermelho, desencadeando uma série de alterações metabólicas e funcionais (KARU, 1989; RIBEIRO, 2000).

O laser em baixa intensidade quando absorvido pelos tecidos proporciona efeitos não térmicos tornando-o capaz de induzir biomodulação tecidual e reparação, bem como ação antiinflamatória e analgésica local e seus efeitos têm sido demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (KUJAWA et al., 2004; MOORE et al., 2005; REDDY, 2004; TAM, 1999; WALSH, 1997). A biomodulação tecidual ocorre por meio de proliferação, adesão, respiração, produção de proteínas e outros produtos celulares (ALMEIDA-

LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; BOLTON; DYSON; YOUNG, 1992; BRONDON; STADLER; LANZAFAME, 2005; FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006; HAWKINS, ABRAHAMSE, 2005; KUJAWA et al., 2004; MARQUES et al., 2004; MOORE et al., 2005; NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001; PATRUTA et al., 2004; PEREIRA et al., 2002; QUADRI et al., 2005; SHIMIZU et al., 1995; SIPOSAN; LUKACS, 2000; YOUNG et al., 1989).

A LILT não é baseada em elevação térmica, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim majoritariamente, em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e ou fotobiológicos nas células e nos tecidos. Quando a luz interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas. Este efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem sua função debilitada (KARU, 1989; RIBEIRO, 2000).

Trabalhos encontrados na literatura mostram que a terapia com o laser em baixa intensidade têm efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúrias ao tecido (RIBEIRO, 2000). Acredita-se que a energia da luz laser tem melhor aproveitamento onde é mais necessária. Isso também tem sido observado em células cultivadas onde os efeitos dos lasers em baixa intensidade são mais pronunciados quando aplicados sobre culturas crescidas em déficit nutricional (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006; MARQUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2002).

Os lasers em baixa intensidade mais utilizados em odontologia são os de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), do tipo de semicondutor de dupla heterojunção, que torna possível sua emissão de forma contínua em temperatura ambiente. O bombeamento

dos lasers semicondutores pode ser realizado de várias maneiras, entre elas, por um outro laser. Porém a forma mais usual é a utilização do semicondutor na forma de um diodo, com excitação produzida por uma corrente elétrica. Eles apresentam potências médias de algumas centenas de miliwatts, em sua maioria apresentam emissão continua ou em alguns casos emitem pulsos curtos e com comprimentos de onda na faixa do vermelho até infravermelho. Além disso, sabe-se que estes comprimentos de onda atingem grande profundidade de penetração nos tecidos, pois a água e a hemoglobina oferecem um baixo coeficiente de absorção para este tipo de radiação (RIBEIRO, 2000).

A literatura mostra que não há efeitos colaterais e contra-indicações relacionados à LILT, desde que essa terapia seja administrada corretamente. Também não há efeitos prejudiciais relacionados a esta terapia, excetuando-se a incidência do feixe, direta ou indiretamente nos olhos, o que é evitado com a utilização de óculos de proteção apropriados (RIBEIRO, 2000; ÚNER; HODE, 1998).

O processo de bioestimulação laser é um fenômeno fotobiológico, não sendo necessário que a luz seja coerente, os fotoaceitadores primários são componentes da cadeia respiratória, que dependendo da dose podem ser estimulados ou inibidos. A radiação laser é apenas uma desencadeadora para a regulação do metabolismo celular, por esse motivo é que são necessárias apenas baixas doses de energia. O efeito sobre a célula vai depender do estado fisiológico que esta se encontra. Os efeitos terapêuticos da LILT poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis (KARU, 1989).

Em Endodontia, a LILT vem sendo aplicada em casos de hiperemia pulpar, após serem afastados os agentes etiológicos que poderiam ser resolvidos sem o tratamento com o laser, após pulpotomia, pós-pulpectomia e após cirurgia parendodôntica para se acelerar o processo de reparação, prevenindo dores e desconfortos pós-operatórios aos pacientes submetidos a qualquer um dos procedimentos, citados acima, controlando a inflamação (EDUARDO; GOUW-SOARES, 2001; GOUW-SOARES et al., 2001; KIMURA; WILDER-SMITH; MATSUMOTO, 2000; KREISLER et al., 2004).

O mecanismo de ação da LILT ainda não está totalmente esclarecido. Portanto, tornou-se interessante estudar sua ação sobre os macrófagos após ativação clássica ocorrida por contato com LPS (MOSSER, 2003; NASCIMENTO, 2000) de *Escherichia coli* e de IFN- γ (MOSSER, 2003; RODRÍGUEZ et al., 2003), seguida do contato desses macrófagos ativados com cimentos endodônticos, que acidentalmente podem extravasar para o periodonto apical quando das manobras de obturação endodôntica.

Vale ressaltar que o emprego da metodologia *in vitro* proposta neste trabalho se fortaleceu frente aos problemas éticos relacionados ao uso do laser *in vivo*, por ser essa uma modalidade terapêutica recentemente introduzida na Odontologia. Nosso estudo, portanto, pode fornecer dados relevantes sobre o uso da LILT frente a situações clínicas de Endodontia em que fatores diversos podem influenciar, retardar e até impedir o reparo apical.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem por finalidade observar o efeito do tratamento com laser em baixa intensidade (LILT) sobre a secreção de alguns mediadores inflamatórios, tais com IL-1 β , TNF- α e MMP-1 por macrófagos ativados com IFN- γ e LPS, e estimulados por substâncias liberadas durante a presa de três tipos de cimentos endodônticos (um à base de óxido de zinco, outro à base de hidróxido de cálcio e um terceiro resinoso).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo dos cimentos

Os tipos de cimentos utilizados, nomes comerciais, composição, proporções e manipulação seguem abaixo.

Cimento à base de óxido de zinco e eugenol:

Nome comercial: Pulp canal sealer EWT (Kerr, Romulus, Michigan, EUA)

Composição (Quadro 4.1):

Pó	Líquido
Óxido de zinco	Óleo de cravo
Prata precipitada	Bálsamo do Canadá
Subcarbonato de bismuto	
Sulfato de bário	

Quadro 4.1 - Composição do Pulp Canal Sealer EWT

Proporções e manipulação:

O cimento foi preparado empregando-se os dosadores fornecidos pelo fabricante. Assim, uma medida de pó e uma gota de líquido foram depositados sobre uma placa de vidro despolida e espatuladas com auxílio de uma espátula de nº 24, até o alcance de consistência habitual ao uso clínico.

Cimento à base de hidróxido de cálcio:

Nome comercial:

Sealapex (Kerr, Romulus, Michigan, EUA)

Composição (Quadro 4.2):

Base	Catalisador
Óxido de cálcio	Sulfato de bário
Óxido de zinco	Resina polimetilenometilsalicilato
Composto a base de sulfanamida e sílica	Dióxido de titânio
	Silica, pigmentos
	Salicilato de isobutila

Quadro 4.2 - Composição do Sealapex

Proporções e manipulação:

Foram misturadas porções iguais da base e do catalisador até obter-se pasta de cor homogênea e consistência compatível com o uso clínico.

Cimento à base de epóxi-resina:

Nome comercial:

AH-Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Swiss, distribuído por Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil).

Composição (Quadro 4.3):

Pasta A	Pasta B
Diglicidil éter de: Bisfenol - A Bisfenol - F	1 - adamantanamine
Tungstato de cálcio	N,N –Dibenzil-5-oxanonan - diamina -1,9 (OPC - 91)
Óxido de zircônio	TCD-diamine
Aerosil	Tungstato de cálcio
Pigmentos	Óxido de zircônio
	Óleo de silicone
	Aerosil

Quadro 4.3 - Composição do AHPlus

Proporção e manipulação:

Foram misturadas quantidades iguais (1:1) das pastas A e B (conforme orientação do fabricante) sobre uma placa de vidro, usando uma espátula metálica até obter-se uma pasta visualmente homogeneizada.

4.2 Condicionamento do meio de cultivo celular pelos cimentos

O meio de cultivo (RPMI 1640) foi colocado em contato com os cimentos individualmente durante sua presa em estufa com atmosfera úmida e temperatura de 37 °C, seguindo o preconizado pela *International Standard Organization*, Norma ISO 74075 - *Dentistry* (1997). Utilizou-se 0,2 g de cada cimento para cada 1 mL de meio RPMI 1640, para obtenção dos extratos de meios condicionados (meios de estoque).

Para a primeira parte da pesquisa (citotoxicidade usando análise da atividade mitocondrial) foram utilizados os três tipos de cimentos endodônticos manipulados, de acordo com instruções dos fabricantes. A ISO recomenda o condicionamento por 24 h. No entanto, para simular a condição clínica onde após a obturação e o início da irradiação normalmente são decorridos em média 1h, testamos ambas as condições. Os cimentos condicionaram o meio de cultura durante as suas presas por dois períodos, a saber: 24 h e 1 h.

Em decorrência dos resultados obtidos nos experimentos acima, na segunda parte da pesquisa (análise do efeito da LILT) foi utilizado somente o período de condicionamento do meio de cultura pelos cimentos endodônticos de 1 h.

4.3 Obtenção dos macrófagos

Foram utilizados 10 camundongos isogênicos BALB, machos, com peso aproximadamente de 25 gramas de peso, entre seis e oito semanas de idade, criados no biotério da Escola Paulista de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Esses animais foram mantidos em gaiolas específicas, e alimentados com ração comercial em flocos e água *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, protocolo 02/04, sob parecer 02/04 (Anexo A). O método escolhido para a obtenção de macrófagos, em princípio, foi o sugerido por Metzger, Berg e Dotan (1997) utilizado por Sousa e Aun (2003) com modificações propostas por Rodríguez et al. (2003).

Primeiramente os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 1 mL de solução de tioglicolato de sódio a 5 % (Merck, Alemanha) e permaneceram por cinco dias para que ocorresse a peritonite crônica sob observação contínua. Decorrido esse tempo, a ortotanásia dos camundongos foi feita usando-se o método de deslocamento

cervical. Imediatamente após foi injetado intraperitonealmente 5 mL de solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBSA), a 4 °C. Após massagem na cavidade abdominal, o líquido de ascite induzido dos camundongos foi recuperado por aspiração com seringa dotada de agulha 0,45 x 13 mm e transferido para tubo de ensaio.

Dessa suspensão foram removidos 0,2 mL para a submissão de coloração May-Grünwald e Giemsa modificado por Rosenfeld para identificação morfológica das células do lavado peritoneal (DI FIORI, 1991; ROSENFELD, 1947).

Após a identificação dos macrófagos, foi retirado da suspensão das células restantes 90 µL que foram transferidos para um tubo tipo Eppendorf onde foi acrescido 10 µL de violeta cristal (0,05 % de violeta cristal dissolvido em 3 % de ácido acético) para a contagem do número de células. A contagem foi feita em câmara tipo Neubauer. O número total de células da suspensão foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{Número total de células} \times \text{diluição} \times 10^4$$

Número de quadrados do hemocitômetro usados para a contagem

Após a contagem, foram centrifugadas a 1000 RPM, 10 min a 4 °C e plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em número de poços variáveis de acordo com os experimentos, que foram realizados *overnight* após a adesão dos macrófagos nas placas. Após essa incubação os poços foram lavados com PBSA e mantidos em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino, ambos da Cultilab – Campinas, São Paulo, Brasil.

4.4 Análise da citotoxicidade de substâncias liberadas por cimentos endodônticos

Antes de realizar os experimentos de ativação e estimulação dos macrófagos com as substâncias liberadas durante a presa dos cimentos foi necessário analisar se estas substâncias seriam ou não citotóxicas *per se* aos macrófagos, o que poderia auxiliar no entendimento dos futuros resultados obtidos neste estudo.

Para o teste de citotoxicidade foram semeados 42 poços da placa de 96 poços (2×10^5 células/poço - n=6 réplicas para cada grupo experimental).

Os grupos experimentais desta fase do trabalho foram os seguintes:

Grupo Controle

Grupo MCA 1 h – Meio condicionado com AH-Plus

Grupo MCS 1h – Meio condicionado com Sealapex

Grupo MCP 1h – Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT

Grupo MCA 24 h – Meio condicionado com AH-Plus

Grupo MCS 24 h – Meio condicionado com Sealapex

Grupo MCP 24 h – Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT

O teste de citotoxicidade foi baseado na análise da atividade mitocondrial dos macrófagos pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é insolúvel em água, em um formazan solúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 570 nm. Para a realização do teste foram preparados os reagentes A e B. O reagente A era composto por 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá) em 10 mL de PBSA e o reagente B foi constituído por 1 g de SDS (QBioGene, EUA) em 10 mL de 0,01 M de HCl.

Os meios de cultura dos 42 poços foram retirados e substituídos pelos meios condicionados pelos cimentos e diluídos a 10 %, ou por meio RPMI fresco (controle), que ficaram incubados, em contato com as células durante 1 h. Após esse período os meios condicionados ou não foram aspirados e substituídos por 100 μ L de meio RPMI 1640 fresco. Adicionou-se 10 μ L do reagente A em cada poço, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro. Esses poços sem células, só com meio de cultivo, ficavam nas colunas 1 e 9 da placa de 96 poços (figura 4.1). Depois de 4 h de incubação com o reagente A, em estufa a 37 °C foi adicionado 100 μ L do reagente B em cada poço (figura 4.2). As culturas retornaram para incubação em estufa a 37 °C por mais 4 h. Decorrido esse período as culturas foram misturadas gentilmente com auxílio de pipetador multicanal (figura 4.3) e levado para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) com leitor de 570 nm (figura 4.4).

Figura 4.1 - Distribuição do plaqueamento das células e das fileiras de calibragem para análise da atividade mitocondrial

Figura 4.2 - Aspecto dos poços após a adição de 10 μ L do reagente A

Figura 4.3 - Aspecto dos poços após a adição de 100 μ L do reagente B

Figura 4.4 - Aspecto dos poços após o final do experimento, no momento da leitura em espectrofotômetro

Figura 4.5 - Leitura da absorbância no espectrofotômetro ELISA

4.5 Ativação clássica dos macrófagos

Foram utilizadas as proteínas LPS e IFN- γ para ativar os macrófagos, para aproximar essa metodologia *in vitro* da realidade *in vivo*, onde na região periapical os macrófagos estão ativados pela presença dessas proteínas liberados pelas bactérias presentes na região (STASHENKO, 1990).

Após a obtenção de macrófagos do lavado peritoneal esses foram ativados *in vitro* classicamente por 24 h com 20 μ g/mL de IFN- γ para camundongos (recombinante de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich Chemical Inc., St. Louis, MO, EUA) (0,1 mL/poço) conforme utilizado por Boehm et al. (1997), Llovera et al. (2001), Malu et al. (2003), Mosser (2003), Rodrigues et al. (2003), Rodríguez et al. (2003) e Wesley et al. (2005) e 10 ng/ml de LPS (0,1 mL/poço) proveniente da parede celular da bactéria *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Chemical Inc., St. Louis, MO, EUA) (CUSCHIERI et al., 2004; KELLER; RODRÍGUEZ; RUSSO, 2005; LLOVERA et al., 2001; NASCIMENTO, 2000; RODRÍGUEZ et al., 2003).

E. coli foi escolhida por ser uma bactéria Gram-negativa que libera o LPS de sua parede celular durante sua duplicação ou morte. Apesar de estar presente em pequena quantidade em processos endodônticos, elas fazem associação com outras bactérias nos canais radiculares infectados (PEUCILENE et al., 2001). É sabido que o LPS em conjunto com o IFN- γ é um ativador clássico de macrófago, estimulando nestes a liberação das citocinas IL- β e TNF- α (BREWINGTON et al., 2001; LLOVERA et al.,

2001; MOSSER, 2003; CUSCHIERI et al., 2004). Após a ativação dos macrófagos, os meios de cultura contendo o LPS e o IFN- γ , foram trocados por meios condicionados por cimentos endodônticos.

Para a avaliação do efeito da LILT nos macrófagos ativados e estimulados por cimentos endodônticos foi utilizada a quantidade de 12 poços (4 grupos e 3 réplicas) em 2 placas de 96 poços (1 para grupos irradiados e 1 para os não irradiados), totalizando 24 poços contendo 2×10^5 células/poço. A distribuição dos poços está exemplificada na figura 4.6. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Figura 4.6 - Distribuição das células semeadas em 12 poços das placas de 96 poços

As culturas foram incubadas *overnight* e então lavadas com PBSA para a remoção das células não aderentes. Após esse procedimento, tanto polimorfonucleares quanto linfócitos não foram detectados e a população celular estava constituída

basicamente de macrófagos. Para esta fase do trabalho foram analisados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 MCAi – Meio condicionado com AH-Plus e irradiação

Grupo 2 MCA – Meio condicionado com AH-Plus

Grupo 3 MCSi – Meio condicionado com Sealapex e irradiação

Grupo 4 MCS – Meio condicionado com Sealapex

Grupo 5 MCPi – Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT e irradiação

Grupo 6 MCP – Meio condicionado com Pulp Canal Sealer EWT

Grupo 7 MDFi – Meio DME fresco e irradiação (controle 1)

Grupo 8 MDF – Meio DME fresco (controle 2)

Após a ativação dos macrófagos os meios dos poços foram substituídos por 100 µl dos meios condicionados, diluídos a 10 %, ou 100 µl de meio fresco (controles). Para simular o tempo usado pelo cirurgião-dentista entre a obturação final do canal radicular e a restauração do dente foi aguardada 1 hora, nesse momento as células receberam ou não irradiação com laser em baixa intensidade.

4.6 Irradiação laser

Foi utilizado o aparelho de laser Twin Laser (gentilmente cedido pelo Laboratório Especial de Laser em Odontologia – LELO, Universidade de São Paulo, São Paulo,

Brasil e produzido pela empresa MM Optics Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil, possuidor das seguintes especificações:

Características de emissão	Comprimento de onda	Potência do emissor	Meio ativo
Emissor Laser visível	660 nm	40 mW	Semicondutor
Emissor Laser infravermelho	780 nm	70 mW	Semicondutor

Quadro 4.4 - Especificações do fabricante do Twin Laser

Após 1 hora em que os meios condicionados ou não pelos cimentos foram colocados nas placas, os mesmos foram aspirados, os poços lavados com PBSA e, nesse momento, foram colocados 0,2 mL de meio RPMI 1640 sem soro em cada poço. Para o uso dos *kits* ELISA há a necessidade de se eliminar o soro do meio para que não haja interferência entre os reagentes ELISA e os componentes do soro, sendo assim, só se analisam o que a célula secretou.

A seguir, foi feita irradiação nas placas experimentais e a simulação de irradiação nas placas controles. A aplicação foi dupla com intervalo de 6 horas (PEREIRA et al., 2002), pontual, por contato, com semicondutor emitindo radiação infravermelho e contínua, nos seguintes parâmetros (Quadro 4.5):

Comprimento de onda	780 nm
Potência	70 mW
Densidade de energia	3 J/cm ²
Diâmetro da ponta da fibra	4 mm ²

Quadro 4.5 - Parâmetros utilizados nas culturas celulares que foram irradiadas

As placas de 96 poços foram posicionadas com auxílio de um suporte para aplicação do laser desenvolvido para esse intuito como demonstram as figuras 4.7 e 4.8. As placas que não sofreram irradiação (os controles) receberam os mesmos tratamentos experimentais dos poços irradiados simulando cada passo da aplicação do laser em baixa intensidade anteriormente descrito, porém sem que o equipamento de laser fosse ligado.

Figura 4.7 - Suporte desenvolvido para aplicação padronizada do laser nos poços (Capela de fluxo laminar com suporte para a irradiação do laser e placa pronta para ser irradiada)

Figura 4.8 - Detalhe da ponta padrão 4 mm² fixada ao suporte na posição horizontal para total paralelismo e contato com o fundo dos poços

Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada (Figuras 4.9 e 4.10). Sabendo que a distância entre o laser e a superfície de aplicação é crítica, mantivemos a distância entre o feixe laser e as células constante. A aplicação do laser foi feita em contato e através da base das placas de cultivo celular de 96 poços, portanto o feixe laser não teve que atravessar o meio de cultura sendo aplicado diretamente na monocamada celular. As placas são compostas por poliestireno transparente e têm menos de 1 mm de espessura. A área cultivável das placas é de 3 mm².

Figura 4.9 - Placa com cobertura, já com a monocamada ao fundo do poço, indicando local padronizado

Figura 4.10 - Demonstração do feixe irradiado na tela com perfuração padronizada

A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura feita de papelão preto fosco com perfurações de acordo com a localização dos poços. As perfurações foram padronizadas com auxílio de perfurador de um furo (One hole Punch 97A0, Shanghai Genmes, China) com telas internas móveis, do mesmo material usado para confecção da máscara, de um furo somente, de acordo com a posição do poço, deixando somente a área a ser irradiada exposta (PEREIRA et al., 2002).

Para verificar a saída de potência do equipamento foi utilizado um medidor de potência (gentilmente cedido pelo LELO) antes e depois dos experimentos (Power meter, MM Optics Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil).

Após as irradiações ou simulações as placas foram novamente incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ e tiveram os meios colhidos em 0, 12 e 24 horas. As amostras foram congeladas para posterior análise. Esses meios foram descongelados e analisados por meio do teste de ELISA para a detecção e quantificação de IL -1 β , TNF- α e MMP-1.

4.7 Detecção das enzimas pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A análise da liberação dos mediadores químicos da inflamação pelos macrófagos após contato com os meios condicionados pelos diferentes tipos de cimentos endodônticos seguida ou não da aplicação do LILT foi observada pelo método enzimático no teste ELISA. Os testes foram feitos nas amostras obtidas na fase inicial dos experimentos em triplicata, através de *kits* ELISA para IL -1 β (RPN-2720), TNF- α (RPN-2718), e MMP-1 (RPN-2629), todos produzidos pela Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, para os quais foram seguidas as instruções de diluição, preparo e leituras fornecidas pelo fabricante para cada um dos *kits*.

4.7.1 Instruções seguidas para detecção e quantificação da MMP-1

Primeiro dia – preparo dos padrões, da solução tampão de análise e de lavagem.

a) Preparo da solução tampão de análise

- Transferiu-se o conteúdo do frasco da solução tampão de análise para um recipiente com capacidade de 100 mL com auxílio de água destilada.
- Ajustou-se o volume final para 100 mL com água destilada e homogeneizamos.

b) Preparo do padrão

- Adicionou-se 1 mL da solução tampão de análise para o tubo contendo o estoque padrão, fechamos o recipiente e gentilmente misturamos para sua completa dissolução.
- O recipiente foi armazenado no gelo até o momento do uso.

c) Preparo da solução tampão de lavagem

- Transferiu-se o conteúdo do frasco para um recipiente com capacidade de 500 mL com auxílio de água destilada.
- Ajustou-se o volume final para 500 mL com água destilada e homogeneizamos.

- Armazenou-se em temperatura ambiente com o recipiente fechado até o momento para uso.

Segundo dia – preparo do APMA, enzima de detecção, substrato e reagente de detecção.

a) Preparo do APMA

- Adicionou-se 1 mL de DMSO no frasco e tampou-se o mesmo.
- Levou-se o frasco para o *vortex* até sua completa diluição. Essa foi a solução concentrada APMA (1 M).
- Adicionou-se 5 µL da solução concentrada APMA em um tubo contendo 20 mL da solução tampão de análise à temperatura ambiente e levou-se ao *vortex* para homogeneização.
- Adicionou-se 1 mL da solução acima em um tubo contendo 9 mL da solução tampão de análise à temperatura ambiente e levou-se ao *vortex* para homogeneização. Essa foi a solução APMA para uso imediato (0,025 mM).

b) enzima de detecção

- Deixou-se o tubo contendo a enzima de detecção fora do congelador por 10 min antes do uso.
- Armazenou-se no gelo até o uso.

c) substrato

- Adicionou-se 5,1 mL da solução tampão de análise no frasco e tampou-se o mesmo.
- Misturou-se gentilmente os conteúdos até a completa dissolução.
- Armazenou-se no congelador até o momento do uso.

d) reagente de detecção

- Adicionou-se 100 μ L do concentrado da enzima de detecção ao substrato reconstituído.
- Homogeneizou-se gentilmente.
- Adicionou-se 50 μ L do reagente de detecção em cada poço durante o protocolo de análise.

Preparação das soluções padrões

- Separou-se 5 tubos de polipropileno para 0, 3; 1,3; 6,25; 12,5; 25 e 50 ng/mL.
- Pipetou-se 500 μ L da solução tampão de análise em cada tubo.
- Pipetou-se 500 μ L do estoque padrão (100 ng/mL) no tubo de 50 ng/mL.
- Misturou-se o conteúdo no *vortex*.
- Pipetou-se 500 μ L do tubo de 50 ng/mL no tubo de 25 ng/mL.

- Misturou-se o conteúdo no *vortex*.
- Repetiu-se esse passo de diluição dobrada sucessivamente com os tubos restantes.
- Alíquotas de 100 μ L de cada diluição seriada forneceu 5 níveis de padrões crescentes de pró-MMP-1 de 3.13 até 50 ng/ mL.

No primeiro dia também foram desenvolvidos os passos abaixo para o protocolo de análise.

- Preparou-se os reagentes conforme descrito acima.
- Preparou-se os padrões seriados conforme descrito anteriormente.
- Pipetou-se 100 μ L da solução tampão de análise nos poços de padrões zero.
- Pipetou-se 100 μ L de cada padrão seriado dentro do poço respectivo.
- Pipetou-se 100 μ L das amostras a serem analisadas.
- Cobriu-se a placa com a tampa apropriada e deixou-se em temperatura entre 2 e 8 °C *overnight*.

No segundo dia após o preparo das substâncias acima citadas e nesse mesmo dia.

- Aspirou-se e lavou-se todos os poços 4 vezes com a solução tampão de lavagem com lavadora automática apropriada.
- Cobriu-se com papel absorvente para assegurar a remoção de qualquer volume residual do processo de lavagem.
- Preparou-se o reagente de detecção conforme descrito previamente.
- Pipetou-se 50 μ L da solução APMA pronta para o uso nos poços contendo os padrões e nos contendo as amostras a serem analisadas.
- Pipetou-se 50 μ L da solução tampão de análise nos poços contendo as amostras para análise.
- Pipetou-se 50 μ L do reagente de detecção em todos os poços.
- Na leitora ELISA balançou-se a placa por 20 s.
- Leu-se a placa com 405 nm para obter o valor t_0
- Cobriu-se a placa com a tampa e incubou-se a 37 °C por 90 min.
- Na leitora ELISA balançou-se a placa por 20 s.
- Leu-se a placa com 405 nm para obter o valor final.

4.7.2 Instruções seguidas para detecção e quantificação das citocinas TNF- α e IL-1 β

Preparo dos reagentes:

a) solução tampão de análise concentrada

- A formação de qualquer precipitado durante o armazenamento se diluiu durante o preparo.
- Diluiu-se o conteúdo do frasco de solução tampão de análise em 1500 mL.
- Armazenou-se a temperatura entre 2 e 8 °C até o momento do uso.

b) solução de streptavidina-HRP

- Preparou-se a quantidade exata a ser usada dentro do período máximo de 15 min para o TNF-a e 60 min da IL-1 β .
- Para a sua aplicação usou-se uma pipetagem vigorosa para sua entrada nos poços.
- Adicionou-se 30 μ L da solução concentrada de streptavidina-HRP em 12 mL da solução tampão de diluição de streptavidina-HRP em tubo de 15 mL e misturou-se gentilmente.

c) preparo dos padrões do (m) TNF-a e (m) IL-1 β

- Reconstituiu-se o padrão (m) TNF-a e do padrão da (m) IL-1 β em meio de cultura RPMI 1640 fresco sem soro em tubos de ensaio com auxílio de micropipetadores.

- A reconstituição produziu a solução padrão de estoque de 2450 pg/mL para o TNF- α e de 4000 pg/mL para a IL-1 β .
- A solução padrão de estoque foi usada para diluição seriada de 50 a 2450 pg/mL do TNF- α de camundongo e de 15 a 1000 pg/mL do IL-1 β de camundongo.

d) preparo das curvas padrão

- Fez-se a diluição seriada em dois tubos da solução padrão estoque do (m) TNF- α .
- Pipetou-se 600 μ L de diluente apropriado em cada tubo.
- Pipetou-se 100 μ L do padrão reconstituído de TNF α no primeiro tubo para a formação de 350 pg/mL e misturou-se.
- Pipetou-se 100 μ L dessa solução em outro tubo para formar o de 50 pg/mL e misturou-se.
- As concentrações de 2450 pg/mL, 350 pg/mL e 50 pg/mL formaram os pontos para a formação da curva padrão do TNF- α .
- Fez-se a diluição seriada em cinco tubos da solução padrão estoque do IL-1 β camundongo.
- Pipetou-se 300 μ L de apropriado diluente em cada tubo.
- Pipetou-se 100 μ L do padrão reconstituído do IL-1 β de camundongo no primeiro tubo para o de 1000 pg/mL.
- Pipetou-se 100 μ L dessa solução no segundo tubo para o de 250 pg/mL.

- Repetiu-se o procedimento mais duas vezes para formar o de 62,5 pg/mL e 15,6 pg/mL com o padrão zero pg/mL.

Protocolo de análise

- Preparo dos reagentes para a análise e os padrões seriados conforme descrito anteriormente.
- Adicionou-se 50 μ L da solução padrão e das amostras a serem analisada por poço em duplicata (no caso do TNF- α) e 50 μ L do reagente de anticorpo biotinilatado em todos os poços a serem usados (no caso da IL-1 β).
- Adicionou-se 50 μ L do reagente de anticorpo biotinilatado (no caso do TNF- α) e adicionou-se 50 μ L do padrão reconstituído ou das amostras a serem analisadas, adicionando 50 μ L de meio de cultura fresco no padrão zero (no caso da IL-1 β) e cobriu-se ambos *kits* com adesivo apropriado e incubou-se por 2 h em temperatura ambiente.
- Aspirou-se e lavou-se cada poço repetindo esse procedimento por 4 vezes para o *kit* do TNF- α e 2 vezes para o *kit* da IL-1 β , removendo o excesso de volume com papel absorvente.
- Adicionou-se 100 μ L de streptavidina-HRP conjugada, cobriu-se com adesivo apropriado e incubaram-se ambos por 30 min em temperatura ambiente.
- Repetiu-se o procedimento de aspiração e lavagem para cada *kit* conforme descrito anteriormente.

- Adicionou-se 100 μ L de solução de substrato TMB em cada poço, incubou-se por 30 min em temperatura ambiente em câmara escura.
- Adicionou-se 100 μ L da solução *stop* em cada poço.
- Determinou-se a absorbância de cada *kit* usando espectrofotômetro de 450 nm comparando as densidades ópticas das amostras com os padrões.

4.8 Análise estatística

Todos os dados desta pesquisa foram tratados estatisticamente com auxílio do *software* BioStat 3.0. A normalidade ou não da distribuição amostral de cada conjunto de dados foi verificada por meio do teste de Kolmogorov - Smirnov (Lilliefors). Quando a distribuição dos dados mostrou-se não aderente à curva de distribuição amostral normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman e quando aderente utilizou-se a Análise de Variância, considerando-se em ambos tratamentos o nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$). Vale ressaltar que mesmo quando as amostras foram não aderentes à curva de distribuição amostral normal, o teste não paramétrico foi aplicado, porque os testes de redução do MTT, bem como os ELISA são extremamente sensíveis e reproduzíveis, o que demonstra não haver necessidade de se aumentar as amostras em busca de se obter normalidade e utilização de testes paramétricos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Identificação dos macrófagos peritoneais

Usando a coloração de May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld (1947) foi possível a identificação da população de células do líquido de ascite recolhido intraperitonealmente de camundongos machos BALB. Conforme ilustrado na figura 5.1, um dos exemplares dessa observação.

Figura 5.1 - Identificação das células obtidas do líquido de ascite dos camundongos. (May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld; X 400)

5.2 Análise da citotoxicidade dos cimentos endodônticos

Os dados das densidades ópticas dos grupos experimentais foram transformados em porcentagem em relação ao controle considerado como 100 %.

A viabilidade com os meios condicionados por 1 e 24 h de todos os grupos experimentais foram similares ao controle. Quando comparamos os resultados dentro dos mesmos grupos experimentais 1h contra 24 h não houve diferença estatística, exceto em 24 h a porcentagem de viabilidade celular foi significativamente maior que em 1 h para o cimento Pulp Canal Sealer EWT ($p \leq 0,05$; tabela 5.1; figura 5.2).

Tabela 5.1 - Teste de Friedman para análise MTT

	Controle	MCA 1 h	MCA 24 h	MCS 1 h	MCS 24 h	MCP 1 h	MCP 24 h
Soma dos <i>ranks</i>	22	18	26	20	33	12	37
Mediana	101,65	94,03	109,60	94,48	113,90	76,60	121,85
Média dos <i>ranks</i>	3,66	3	4,33	3,33	5,5	2	6,16
Média dos valores	100	94,66	103,93	86,35	110,41	78,21	120,49
Desvio padrão	10,56	15,55	15,5	34,19	14,04	26,32	16,32
Friedman (Fr)	16,21						
Graus de liberdade	6						
(p)	0,01

Figura 5.2 - Médias de viabilidade celular dos macrófagos tratados pelas substâncias liberadas por cimentos endodônticos nos períodos de 1 e 24 h de condicionamento do meio de cultura celular. As barras correspondem aos erros padrões das médias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$)

5.3 Análise de produção e quantificação de MMP-1

Em todos os grupos experimentais foram observados nos meios condicionados por macrófagos previamente ativados e estimulados pelos diferentes cimentos endodônticos a secreção de altas quantidades de MMP-1 (de 2,5 a 3 ng/mL). Os dados

de concentração dessa proteína secretada por macrófagos nos grupos experimentais foram também comparados estatisticamente.

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (figura 5.3; tabela 5.2).

Figura 5.3 - Médias das concentrações de MMP-1, nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias

Tabela 5.2 - Análise de Variância da produção e quantificação de MMP-1

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	7	0,97	0,13
Erro	64	10,87	0,17
F	0,82		
(p)	0,57		

5.4 Análise de produção e quantificação de TNF- α

Foi observada a presença de TNF- α em todos os grupos experimentais. Essa proteína foi encontrada em concentrações médias de 20 a 80 pg/mL e comparadas estatisticamente. Não houve diferença estatística entre os grupos (figura 5.4; tabela 5.3).

Figura 5.4 - Médias das concentrações de TNF- α , nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias

Tabela 5.3 - Teste de Friedman para produção de TNF- α

	MCA I	MCA	MCS I	MCS	MCP I	MCP	Controle I	Controle
Soma dos <i>ranks</i>	54,5	42	37	38	37,5	36,5	38	40,5
Mediana	18,1	1	1	1	1	1	1	1
Média dos <i>ranks</i>	6,05	4,66	4,11	4,22	4,16	4,05	4,22	4,5
Média dos valores	83,65	41,8	15,34	8,63	10,46	9,14	12,19	23,74
Desvio padrão	112,52	72,16	36,16	15,32	19,67	17,26	32,63	46,93
Friedman (Fr)	4,59							
Graus de liberdade	7							
(p)	0,7							

5.5 Análise de produção e quantificação de IL-1 β

Foi observada a presença de IL-1 β em todos os grupos experimentais. Essa proteína foi encontrada em concentrações de médias de 2 a 15 pg/mL, sendo os resultados comparados estatisticamente. Não houve diferença estatística entre os grupos (tabela 5.4; figura 5.5).

Tabela 5.4 - Teste de Friedman para produção de IL-1 β

	MCA I	MCA	MCS I	MCS	MCP I	MCP	Controle I	Controle
Soma dos ranks	38	38,5	41	48	42	39,5	34,5	42,5
Mediana	1	1	1	1	1	1	1	1
Média dos ranks	4,22	4,27	4,55	5,33	4,66	4,38	3,83	4,72
Média dos valores	1,9	6,80	2,28	6,25	8,78	8,97	1	19,05
Desvio padrão	2,72	17,40	2,81	10,01	14,91	23,91	0	44,66
Friedman (Fr)	2,03							
Graus de liberdade	7							
(p)	0,95

Figura 5.5 - Médias das concentrações de IL-1 β , nos meios condicionados pelos macrófagos, após a estimulação com os diversos cimentos endodônticos testados. As barras correspondem aos erros padrões das médias

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O tratamento dos canais radiculares visa devolver o dente à sua normalidade estética e funcional. Para que seja atingido esse objetivo é importante que se consiga o selamento apical biológico com formação de tecido duro ou fibrosado apostado à região apical. Mas, quando no momento da obturação, os cimentos endodônticos extravasam podem ocorrer alterações no processo inflamatório apical e retardos no processo reparacional de formação do selamento periapical. Alguns profissionais têm usado a terapia com laser em baixa intensidade (LILT) após a obturação endodôntica, no intuito de controlar o processo inflamatório local tendo em vista a aceleração da reparação apical do dente tratado.

A ação dos cimentos no processo inflamatório periapical após a obturação pode ocorrer ou pela sua presença física no tecido periapical, mas também pela presença de substâncias liberadas pelos cimentos quando de seu contato com os tecidos. Assim, este estudo *in vitro* buscou informações acerca do efeito de substâncias liberadas de cimentos comumente utilizados em Endodontia (um à base de óxido de zinco e eugenol – Pulp Canal Sealer EWT, outro à base de hidróxido de cálcio – Sealapex e um terceiro resinoso – AH-Plus) sobre macrófagos, uma célula ativamente envolvida no processo inflamatório e como tal participante da reparação. Nessa análise foi verificada inicialmente a citotoxicidade dessas substâncias, bem como sua ação sobre os processos de secreção de proteínas pró-inflamatórias (MMP-1, TNF- α e IL-1 β) por

macrófagos ativados. Adicionalmente, estudou-se o efeito da LILT nesses processos de secreção de proteínas pró-inflamatórias.

Foi observado que substâncias liberadas daqueles cimentos não mostraram, nas condições deste experimento, atividade citotóxica. Adicionalmente, quando foram aplicadas sobre macrófagos ativados essas substâncias não modificaram os padrões de secreção das proteínas pró-inflamatórias. Essas secreções também não foram alteradas quando da terapia com laser em baixa intensidade (LILT).

Inicialmente, buscou-se analisar a citotoxicidade dos cimentos. Para tanto, se estudou o efeito de meios de cultura condicionados pelos mesmos sobre os macrófagos. Esse condicionamento seguiu o preconizado pela *International Standard Organization* ISO 7405 (1997). Foram determinados dois tempos para esse condicionamento, a saber: 24 h, conforme o ISO 7405 e, 1 h para simular o tempo aproximado que um cirurgião-dentista, não especialista em Endodontia, leva para concluir a obturação do canal radicular, até o momento que, se fosse utilizada a LILT, a radiação poderia ser realizada. Assim, após a obtenção dos macrófagos e sua caracterização morfológica, os mesmos foram submetidos à ação desses meios condicionados, diluídos a 10 %. Essa diluição foi realizada, porque por experiência anterior sabemos que o meio condicionado estoque pode ser citotóxico pela presença de alta concentração de substâncias dos cimentos estudados nele liberadas, e para uma análise comparativa entre diferentes substâncias, quando diluídas nessas proporções, diferenças em citotoxicidade entre os grupos podem ser mais facilmente observadas. Vale ressaltar, que a análise de citotoxicidade só foi realizada em função de possíveis explicações que se fizesse necessárias à cerca dos resultados obtidos na fase seguinte do estudo, quando a secreção de proteínas seria analisada. Caso

houvesse diferenças importantes nesta fase elas poderiam eventualmente ser explicadas em bases de citotoxicidade.

A redução do MTT mostrou que as substâncias liberadas por todos os cimentos analisados nas condições desta pesquisa não foram citotóxicos para os macrófagos. A influência do tempo de 1 h e de 24 h de condicionamento durante a presa dos cimentos endodônticos também não foi relevante, com exceção do grupo tratado com o Pulp Canal Sealer EWT. Nesse grupo o condicionamento por 1 h levou a uma viabilidade celular dos macrófagos, que apesar de ser similar à viabilidade apresentada pelo grupo controle, foi significativamente menor que a viabilidade apresentada para o grupo do Pulp Canal Sealer EWT condicionado por 24 h. Esse achado pode ser explicado pela presença do eugenol na formulação desse cimento. Antes da presa do cimento, as reações químicas entre as substâncias que o compõem ainda não ocorreram totalmente, podendo deixar, por exemplo, eugenol livre nas primeiras horas, o que poderia ter afetado as culturas de células tratadas com meio condicionado por 1 h e deixando de ser tóxico após 24 h.

Anteriormente, utilizando a mesma metodologia aqui aplicada, com meios condicionados por somente 1 h, havíamos observado sobre fibroblastos de polpa humana que a maioria dos cimentos testados não foram citotóxicos, exceto o Pulp Canal Sealer EWT (SOUSA; CAVALCANTI; MARQUES, 2005). No entanto, quando outros cimentos resinosos foram diretamente aplicados sobre fibroblastos de polpa humana observamos citotoxicidade do AH-Plus (SOUSA et al., 2004). Isso indica que os cimentos podem ser mais ou menos citotóxicos dependendo do tipo de célula. Mais ainda, quando os cimentos são diretamente aplicados sobre as células em cultura existe uma tendência de serem mais citotóxicos do que quando analisamos o efeito de

substâncias liberadas pelos mesmos. No entanto, devemos lembrar que testar substâncias liberadas e não o contato direto dos cimentos sobre as células em cultura, ajuda a aproximar mais o modelo *in vitro* do *in vivo*, porque no periápice não só as células que entram em contato direto com o cimento extravasado sofrerão a ação dos mesmos, mas à distância no ligamento periodontal e no osso alveolar, outras células serão alcançadas por subprodutos solubilizados a partir do cimento pelos fluidos teciduais do periodonto apical.

Corroborando nossos achados, Mendes et al. (2003) demonstraram que os cimentos de óxido de zinco e eugenol aqui testados não foram citotóxicos sobre macrófagos, quando aplicados em tubos de polietileno. Em contrapartida outros trabalhos encontraram resultados diversos dos nossos (CAMPS; ABOUT, 2003; SCHWARZE et al., 2002; WILLERSHAUSEN et al., 2000). Esses autores trabalharam com alguns dos cimentos aqui avaliados e mostraram citotoxicidade, no entanto, utilizaram outros tipos celulares, como fibroblastos e células epiteliais e a maioria aplicou os cimentos de forma direta sobre as células.

Mesmo não sendo citotóxicas aos macrófagos, as substâncias liberadas pelos cimentos endodônticos poderiam influenciar a secreção de substâncias pró-inflamatórias dessas células. Mais ainda, as irradiações com laser em baixa intensidade também poderiam ter ações sobre essas secreções. Por essa razão continuamos nossa pesquisa. Porém, para nos aproximarmos ao máximo da situação *in vivo* decidimos ativar os macrófagos porque essas células antes e depois da terapia endodôntica recém finalizada se encontram em estado ativo. São macrófagos com seu volume, sua capacidade de fagocitose, proliferação, secreção de citocinas inflamatórias dentre

outras atividades aumentadas (METZGER, 2000; MOSSER, 2003; NASCIMENTO, 2000).

A ativação foi obtida através da utilização de substâncias encontradas em lesões na região periapical como o IFN- γ e LPS (METZGER, 2000; MOSSER, 2003; PEUCILIENE et al., 2001), ambos provenientes de *E. coli* (AMURA et al., 1997; CUSCHIERI et al., 2004), as concentrações e o tempo de ativação seguiram a literatura (BREWINGTON et al., 2001; LLOVERA et al., 2001; NASCIMENTO, 2000; RODRÍGUEZ et al., 2003). Quando ativados por esse caminho (MOSSER, 2003) é sabido que os macrófagos secretam altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (SUZUKI; OKIJI; SUDA, 1999), o TNF- α (HONG et al., 2004; NASCIMENTO, 2000; SUZUKI; OKIJI; SUDA, 1999; TAKAGI et al., 2005) e MMP-1 (HONG et al., 2004; LAGENTE et al., 2005; NAKATA et al., 2000) que participam de processos de reabsorção e remodelação óssea.

Em relação à produção dessas proteínas, observamos formação de altos níveis de MMP-1 e produção das demais citocinas em todos os grupos. Notamos que os meios condicionados pelos cimentos não foram capazes de alterar a secreção das mesmas.

A MMP-1 já foi detectada em altos níveis em lesões periapicais de humanos. Em análise imunohistoquímica, Shin et al. (2002) demonstraram a presença de MMP-1 em várias células da lesão, inclusive macrófagos. Os autores sugeriram um papel importante dessa MMP-1, entre outras, na destruição do tecido na lesão periapical. Corroborando esses autores Lin et al. (2002) encontraram mRNA codificado para MMP-1 predominantemente em macrófagos de lesões periapicais induzidas em ratos. Isso implica que a MMP-1 já é uma enzima presente em lesões periapicais, mesmo antes do

tratamento das mesmas. Isso vem ao encontro de nossos resultados que mostraram alta produção dessa proteína, mesmo nos grupos controles. Ou seja, a ativação do macrófago já é *per se* um estímulo para a secreção de MMP-1. No entanto, para nossa surpresa, as substâncias liberadas pelos cimentos não foram capazes de alterar essa secreção. Nossa hipótese inicial seria a de que a secreção de MMP-1 aumentaria, já que relatos da literatura têm mostrado que com o extravasamento de cimento pode haver reativação da lesão. Com a reativação das lesões periapicais haveria incremento da reabsorção óssea, portanto, acreditávamos que a MMP-1 estaria envolvida nesse processo. Porém, com base em nos nossos dados podemos concluir que essa reativação da lesão periapical não se deve à maior formação de MMP-1 no local da lesão.

O TNF- α é uma citocina que age através de receptores específicos de membrana que iniciam uma cascata de eventos levando à indução, ativação ou inibição de numerosos genes reguladores de citocinas no núcleo celular. Essa citocina tem papel regulador da inflamação, imunidade e defesa do hospedeiro, além de participar da reabsorção óssea. Além disso, ele ativa macrófagos, portanto deve ter uma ação importante nas lesões periapicais. Em lesões periapicais o TNF- α foi encontrado tanto em exsudato, em teste ELISA (ATAOGLU et al., 2002), como no tecido em análise por ELISA e imunohistoquímica (BLETSA et al., 2004) e mostrou estar altamente expresso em macrófagos de lesões periapicais induzidas em ratos (WANG; TANI-ISHII; STASHENKO, 1997).

Perassi et al. (2004) analisaram a secreção de TNF- α por macrófagos em cultura. Os autores conseguiram encontrar diferenças na liberação do TNF- α quando

compararam a ação de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol com um à base de hidróxido de cálcio, sendo que o último incitou a maior secreção dessa citocina. No nosso trabalho, não conseguimos encontrar diferenças estatísticas entre as quantidades de TNF- α secretados pelos macrófagos tratados por substâncias liberadas pelos cimentos. Essas quantidades também foram semelhantes quando comparadas às dos grupos controle. As diferenças entre os nossos resultados e os de Perassi et al. (2004) podem residir numa série de fatos. Em primeiro lugar, esses autores utilizaram os cimentos diluídos nos meios de cultura, portanto aplicaram esses cimentos diretamente sobre as culturas celulares, enquanto no presente trabalho os macrófagos entraram em contato somente com os meios condicionados pelos cimentos. Em segundo lugar, os autores apenas utilizaram tioglicerol de sódio para a ativação dos macrófagos, enquanto no nosso trabalho utilizamos a ativação clássica com IFN- γ e LPS. Por outro lado, não sabemos se realmente nossos resultados foram tão diferentes, já que as quantidades de TNF- α secretadas pelos macrófagos dos dois trabalhos foram mensuradas com unidades de concentrações diferentes.

As IL-1 são citocinas bioativas na inflamação produzidas principalmente por macrófagos. A IL-1 β foi detectada por vários autores nos sítios inflamatórios, tendo importante atividade na reabsorção óssea (HAMACHI et al., 1995; LIM et al., 1994; STASHENKO, 1990; WANG; TANISHII; STASHENKO, 1997). Não foram encontrados na literatura trabalhos que analisassem a presença e quantificação de IL-1 β em macrófagos tratados por cimentos endodônticos. No nosso estudo não foi possível se observar diferenças estatisticamente significante na produção de IL-1 β pelos diversos grupos experimentais. A produção foi menor que a produção de TNF- α o que nos

causou estranheza, uma vez que na literatura observa-se que a IL-1 β é significativamente mais potente que o TNF- α em lesões periapicais *in vivo* (STASHENKO, 1990). Assim, acreditávamos que encontraríamos mais IL-1 β , que TNF α , no entanto, os autores se referiam à capacidade de causar reabsorção óssea e não à concentração da produção de citocinas. Talvez baixas concentrações de IL-1 β sejam capazes de reabsorver mais tecido ósseo que maiores concentrações de TNF- α .

Finalmente, estudamos a ação da LILT sobre a secreção das proteínas. Clinicamente, a LILT tem ação antiinflamatória, portanto, esperávamos que os grupos irradiados apresentassem produção de proteínas diferente daqueles de grupos não irradiados. No entanto, para a nossa surpresa não encontramos nenhuma diferença estatística, nem sequer entre os grupos controles que não entraram em contato com as substâncias liberadas dos cimentos endodônticos.

Outros autores conseguiram mostrar que a LILT tinha atividade modificando a expressão de citocinas. Shimizu et al. (1995) mostraram inibição de PGE-2 e IL 1 beta após irradiação de células de ligamento periodontal humano em cultura. Young et al. (1989) observaram uma modulação pela LILT com diferentes comprimentos de onda em células tipo macrófago (*macrophages-like cells*) liberando fatores que, dependendo do comprimento de onda usado, incrementaram ou inibiram a proliferação de fibroblastos. Por outro lado, Quadri et al. (2005) apresentaram resultados semelhantes aos nossos, utilizando a LILT em pacientes após terapia periodontal observaram melhoras nos quadros clínicos em comparação aos controles, porém analisando os exsudatos dos sulcos periodontais observaram aumento insignificante da produção de MMP-8, mas, a maioria das citocinas não apresentou modificação de sua expressão.

O parâmetro do laser utilizado pelos autores que analisaram produção de citocinas e tiveram resultados semelhantes aos nossos foi o de um laser de 830 nm e 8,75 J/cm² (QUADRI et al., 2005). Esse comprimento de onda foi similar ao nosso trabalhando na faixa do infravermelho (780 nm), porém com densidade de energia bem maior, mas a irradiação foi realizada *in vivo* e não *in vitro*. Por outro lado, com o comprimento de onda e a densidade de energia semelhante às nossas (820 nm e 2,4 J/cm²) Young et al., (1989) observaram secreção de fatores de crescimento por macrófagos, mas, infelizmente não foram analisadas as citocinas por nós estudadas. Portanto, fica difícil estabelecer se os nossos resultados foram negativos na modificação das secreções em função dos parâmetros utilizados para as irradiações. De fato, há a necessidade de se ampliar este estudo no sentido de se utilizar outros comprimentos de onda e outras densidades de energia.

Tivemos o cuidado de realizar duas irradiações porque, por experiência prévia sabemos que a repetição de irradiações, ao menos para células mesenquimais, leva à potencialização da ação dos lasers sobre crescimento celular. Na verdade, a escolha dos parâmetros se baseou também em trabalhos anteriores onde com 3 J/cm² observamos *in vitro* aumento do crescimento celular, apesar de haver inibição de produção de colágeno (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004). Adicionalmente, nos baseamos nos parâmetros preconizados para tratamento coadjuvante (EDUARDO, GOUW-SOARES, 2001; KREISLER et al., 2004) em Endodontia cuja densidade de energia deve variar de 1 e 10 J/cm². Corroborando essa escolha, Hawkins e Abrahamse (2005) demonstraram que densidades de energias de 10 J/cm² já são altas o suficiente para causar dano celular e molecular nas culturas irradiadas.

Em conclusão podemos observar que com o tipo de ativação macrofágica utilizada neste estudo, bem como os parâmetros do laser utilizados, não foram capazes de, juntamente com a estimulação causada pelas substâncias liberadas por cimentos endodônticos, modificar as secreções de proteínas pró-inflamatórias (MMP-1, TNF- α e IL-1 β) por macrófagos em cultura, ou não tem relevância no modelo proposto neste trabalho. Assim, sugerimos que outros estudos devam ser realizados para maior compreensão dos resultados aqui encontrados, bem como para definir parâmetros da LILT capazes de incrementar a secreção dessas proteínas. Ou por outro lado, mostrar que a ação antiinflamatória da LILT é obtida por outra via, diferente daquelas iniciadas pelas proteínas aqui estudadas, como, por exemplo, outros produtos resultantes do metabolismo dos macrófagos tais como, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO) e fator transformador do crescimento- β 1 (TGF- β 1) que são também tão importantes quanto as citocinas estudadas nos processos inflamatórios, no controle e eliminação de microorganismos e podem participar do dano tecidual.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste estudo concluiu-se que:

Substâncias liberadas pelos cimentos endodônticos não são citotóxicas para macrófagos peritoneais e, não alteram a capacidade destas células ativadas de secretar as proteínas MMP-1, TNF- α e IL-1 β . Adicionalmente, a LILT não interfere na modulação da secreção dessas proteínas, independentemente da presença das substâncias liberadas pelos cimentos endodônticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *J Endod Dent Traumatol* 1994;10:121-8.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29:179-84.

Amura CR, Li-Chun C, Hiroashi N, Lei M-G, Morrison DC. Two functionally independent pathways for lipopolysaccharide-dependent activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1997;159:5079-83.

Ataoglu T, Ungor M, Serpek B, Haliloglu S, Ataoglu H, Ari H. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J* 2002; 35(2):181-5.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of Different Power Densities of LILT on Cultured Human Fibroblasts Growth. A pilot study. *Lasers Med Sci.* no prelo 2006.

Berbert FLCV, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressing and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(2):184-9.

Bletsa A, Heyeraas KJ, Haug SR, Berggren E. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in rat periapical lesions and dental pulp after unilateral sympathectomy. *Neuroimmunomodulation* 2004;11(6):376-84.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-?. *Ann Rev Immunol* 1997;15:749-95.

Bolton P, Dyson M, Young S. The effect of polarized light on the release of growth factors from the U937 macrophage-Like cell Line. *Laser Ther* 1992;4(1):33-7.

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

Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Miranda RN, Norimatsu M, Shyra A. IFN- γ -independent autocrine cytokine regulatory mechanism in reprogramming of macrophage response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167:392-8.

Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. A study of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg Med* 2005;36:409-13.

Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S et al. Conditional macrophages ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 2005;174:2336-42.

Campana V, Moya M, Gavotto A, Juri H, Palma JA. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16(6):317-20.

Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod* 2003;29(9):583-6.

Coil J, Tam E, Waterfield D. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 2004;30(2):88-91.

Collart MA, Bein D, Vassali JD, Kossodo S, Vassali P. γ interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachetin, interleukin-1, and urokinases genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 1986;164:2113-8.

Cuschieri J, Bulmus V, Goulary D, Garcia I, Hoffman A, Stayton P et al. Modulation of macrophage responsiveness to lipopolysaccharide by IRAK-1 manipulation. *Shock* 2004;21(2):182-8.

Dagher FB, Yared GM, Matchou P. Microleakage of a new and an old Kerr root canal sealers. *J Endod* 1997;23(7):442-7.

Daley JM, Reicher JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B et al. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol* 2005;174:2265-72.

De Deus G, Gurgel Filho ED, Ferreira CM, Coutinho Filho T. Penetração intratubular de cimentos endodônticos. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16(4):332-6.

Di Fiori MSH. Atlas de histologia. 7^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A.; 1991.

Durum SK, Schimdt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Ann Rev Immunol* 1985;3:263-87.

Eduardo CP, Gouw-Soares S. The use of lasers for endodontic applications in dentistry. *Med Laser Appl* 2001;16:231-43.

Ejeil A-L, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matix metalloproteinase (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingival. *J Periodontol* 2003;74:188-95.

Facer SR, Walton RE. Intracanal distribution patterns of sealers after lateral condensation. *J Endod* 2003;29(12):832-4.

Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. no prelo 2006.

Gouw-Soares S, Tanji E, Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd: YAG, and Ga-Al-As lasers in periapical surgery: three years clinical case. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19(4):193-8.

Gurgel Filho ED. Estudo das propriedades químicas de cinco marcas comerciais de cones de guta-percha e de suas qualidades seladoras [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2003.

Hamachi T, Anan H, Akamine A, Fujise O. Detection of interleukin-1 β mRNA in rat periapical lesions. *J Endod* 1995;21(3):118-21.

Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wound human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2005;23(3):251-9.

Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LILT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1056:486-93.

Heling I, Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endod* 1996;22(5):257-59.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-9.

Ingman T, Apajalahti S, Mäntylä P, Savolainen P, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *Eur J Orthod* 2005;27:202-7.

International Standard Organization. ISO 7405. Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. 1^a ed. USA; 1997.

Karu, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 1989;56:691-704.

Keller A, Rodríguez D, Russo M. Nitric oxide paradox in asthma. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(supl.1):19-23.

Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1992;60(9):3664-72.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 2000;33(3):173-81.

Kopper PMP, Figueiredo JAP, Bona AD, Vanni JR, Bier CA, Bopp S. Comparative in vivo analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in post-prepared root canals. *Int J Endod* 2003;36:857-63.

Kreisler MB, Al Haj H, Noroozi N, Willershausen B, d'Hoedt B. Efficacy of low level laser therapy in reducing postoperative pain after endodontic surgery – a randomized blind clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:38-41.

Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg* 2004;22(2):111-7.

Lagente V, Manoury B, Nénan S, Lê Quément C, Chouly CM, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1521-30.

Larsen GL, Henson PM. Mediators of inflammation. *Ann Rev Immunol* 1983; 1;335-59.

Leonardo MR. Endodontia – tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. 1ª ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda.; 2005.

Leonardo MR, Salgado AAM, Silva LAB, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dog's teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesq Odontol Bras* 2003;17(1):69-74.

Leonardo MR, Silva LAB, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(1):28-32.

Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod* 2000;26(7):391-4.

Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers – histopatologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod* 1997;23(7):428-32.

Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000;26(6):328-30.

Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin-1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994;20(5):225-7.

Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Wang TJ, Wang JT, Yeh FT et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* 2002;110(3):246-53.

Llovera M, Pearson JD, Moreno C, Riveros-Moreno V. Impaired resposta to interferon- γ in activated macrophages due to tyrosine nitration of STAT1 by endogenous nitric oxide. *Br J Pharma* 2001;132:418-26.

Malu S, Srinivasan S, Maiti PK, Rajagopal D, John B, Nandi D. IFN- γ bioassay: development of a sensitive method by measuring nitric oxide production by peritoneal exudates cells from C57BL/6 mice. *J Immunol Meth* 2003;272:55-65.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34(3):260-5.

Mendes STO, R Ribeiro Sobrinho AP, Carvalho ATC, Côrtes MIS, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophages activity. *J Endod* 2003;29(2):95-9.

Mester E, Yaszszagi-Nagy E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Stud Biophys* 1973;35:227-30.

Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:1-8.

Metzger Z, Berg D, Dotan M. Fibroblast growth *in vitro* suppressed by LPS-activated macrophages. Reversal of suppression by cortisone. *J Endod* 1997;23(8):517-21.

Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 2005;36:8-12.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209-12.

Nakata K, Yamasaki M, Iwata T, Suzuki K, Nakane A, Nakamura H. Anaerobic bacterial extracts influence production of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human dental cells. *J Endod* 2000;26(7):410-3.

Nascimento F. Ativação de células peritoneais por células tumorais, ativadores policlonais ou fungos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biológicas da USP; 2000.

Nassri MRG, Lia RCC, Bombana AC. Estudo comparativo *in vivo* da resposta tecidual quanto ao uso de diferentes materiais obturadores em endodontia. *J Appl Oral Sci* 2003;11(1):9-14.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670-89.

Nomura K, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibition of interleukin-1 β production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2001;16:218-23.

Nomura T, Ishii A, Shimizu H, Taguchi N, Yoshie H, Kusakari H et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-1 and -8, and collagenase activity levels in peri-implant crevicular fluid after implantation. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:430-40.

Patruta S, Franz A, Beer F, Goharkhay K, Sperr W, Moritz A. In vitro stimulatory effect of diode laser on the secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human gingival fibroblasts: a preliminary report. *J Oral Laser Appl* 2004;4(3):167-70.

Peucilene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

Perassi FT, Bonetti Filho I, Berbert FLCV, Carlos IZ, Leonardo RT. Secretion of Tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *J Endod* 2004;30(7):534-7.

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect os low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31(4):263-7.

Pommel L, About I, Pashley D, Camps J. Apical leakage of four endodontic sealers. *J Endod* 2003;29(3):208-10.

Quadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2005;32:714-9.

Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg* 2004;22(2):141-50.

Ribeiro MS. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em

lesões de pele [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas em Energias Nucleares da USP; 2000.

Rodrigues MR, Rodríguez D, Catalani LH, Russo M, Campa A. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. *J Pineal Res* 2003;34: 69-74.

Rodríguez D, Keller AC, Fraquim-Mauro EL, Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 supresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol* 2003;171:1001-8.

Rodríguez-Soto CD. Modulação da asma experimental murina por citocinas e lipopolissacarídeos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biológicas da USP; 2001.

Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem Inst Butantan* 1947;20:315-28.

Sadeghein A, Bolhari B, Sarafnejad A. A comparison of the effects of three endodontic sealers on adherence of mouse peritoneal macrophages. *J Calif Dent Assoc* 2001;29(9):673-7.

Sevimay S, Kalayci A. Evaluation of apical sealing ability and adaptation to dentine of two resin-based sealers. *J Oral Rehabil* 2005;32:105-10.

Schwarze T, Fielder I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod* 2002;28(11):784-6.

Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T et al. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1995;74(7):1382-8.

Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28(4):313-5.

Shnyra A, Brewington R, Alipio A, Amura C, Morrison DC. Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL -10 and IL -12. *J Immunol* 1998; 160: 3729-3736.

Siposan DG, Lukacs A. Effect of low-level laser radiation on some rheological factors in human blood: an *in vitro* study. J Clin Laser Med Surg 2000;18(4):185-95.

Siqueira Jr JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. 1ª Ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2000.

Siqueira Jr JF, Favieri A, Gahyva, SM, Moraes S, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. J Endod 2000; 26(5):274-7.

Siqueira Jr JF, Fraga RC, Garcia PF. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. Endod Dent Traumatol 1995; 11:225-8.

Sonat B, Dalat D, Günhan O. Periapical tissue reaction to root fillings with sealapex. Int Endod J 1990; 23:46-52.

Sousa LR, Aun C E. Obtenção de macrófagos ativados para trabalhos científicos. Rev de Odontologia da UNICID 2003; 15(3):165-72.

Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Efeito de substâncias liberadas por cimentos endodônticos distintos na atividade mitocondrial de fibroblastos de polpa. Braz Oral Res 2005; 19(supl):164.

Sousa LR, Lauretti LGB, Guimarães JLH, Abrão CV, Bombana AC. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos: sealer 26, AH-Plus e do novo sistema resinoso de obturação – Epiphany. Rev Pós-Grad FOU SP 2004; 11(3):285.

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

Suzuki N, Okijii T, Suda H. Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. Arch Oral Biol 1999;44:67-79.

Takagi K, Takagi M, Kanangat S, Warrington KJ, Shigemitsu H, Postlethwaite AE. Modulation of TNF- α gene expression by IFN- γ and pamidronate in murine macrophages: regulation by STAT1-dependent pathways. J Immunol 2005;174:1801-10.

Tam G. Low power laser therapy and analgesic action. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(1):29-33.

Taylor PR, Martinez-Pomares I, Stacey M, Lin H-H, Bronw GD, Gordon S. Macrophages receptors and immune. *Ann Rev Immunol* 2005;23:901-44.

Trowbridge HO, Emling RC. Inflammation- a review of the process. 5^a ed. Carol Stream: Quintessence Publishing Co; 1997.

Tüter G, Kurtis B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metallproteinase-1. *J Periodontol* 2002;73(5):487-93.

Úner J, Hode L. It's all in parameters: a critical analysis of some well-know negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16:245-8.

Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sánchez-Tilló E, López-Iglesias C et al. Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J Biol Chem* 2003;278(47):46307-20.

Xu Q, Fan M-W, Fan B, Cheung GSP, Hu H-L. A new quatitative method using glucose fr analysis of endodontic leakage. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* 2005;99(1):107-11.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J* 1997;42(4):247-54.

Wang C-Y, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:65-71.

Wesley JD, Robbins SC, Sidobre S, Kronenberg M, Terrizzi S, Brossay L. Cutting edge: IFN- γ signaling to macrophages is required for optimal Va14i NK T/NK cell cross-talk. *J Immunol* 2005;174:3864-8.

Whitworth JM, Baco L. Coronal leakage of sealer-only backfill:an in vitro evaluation. *J Endod* 2005;31(4):280-2.

Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod* 2000;26(12):703-7.

Williams LM, Ridley AJ. Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of PyK2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000;164:2028-36.

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med* 1989;9:497-505.

Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root canal sealer. *Int Endod J* 1997;30:332-4.

APÊNDICES

Apêndice A – Dados originais da citotoxicidade dos cimentos em 1 e 24 horas

Controle	MCA 1 h	MCA 24 h	MCS 1 h	MCS 24 h	MCP 1 h	MCP 24 h
80,35	108,83	113,02	52,31	109,49	51,87	127,815
108,16	86,75	72,62	88,30	97,57	83,66	101,32
104,19	112,58	111,03	126,93	118,32	106,40	137,52
109,27	101,32	111,70	100,66	119,42	109,49	115,89
98,89	86,53	107,06	110,81	127,15	69,53	102,87
99,11	71,96	108,16	39,07	90,50	48,34	137,52

Apêndice B – Dados originais da produção e quantificação de MMP-1 em ng/mL

MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
3,04	3,04	3,75	2,49	2,10	2,83	2,88	2,52
3,27	2,86	2,18	2,02	2,41	3,04	3,11	2,80
2,80	2,49	2,91	2,41	1,94	2,57	3,27	2,10
2,57	2,81	2,53	2,18	2,52	2,68	2,26	3,01
2,80	2,86	2,52	2,31	2,31	2,57	2,52	3,19
2,80	2,57	2,52	2,41	2,28	3,19	2,57	2,80
2,57	2,57	2,86	2,88	3,41	2,57	3,46	3,28
2,41	2,80	3,04	2,81	2,81	2,49	2,91	3,29
2,18	2,41	3,19	2,81	3,11	2,41	1,24	2,52

Apêndice C – Dados originais da produção e quantificação de TNF- α em pg/mL

MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
139,80	78,50	1	1	1	25,50	99,20	40,09
1	211,71	1	1	1	1	1	1
318,73	79,99	1	1	1	1	3,51	1
1	1	1	1	31,90	1	1	143,11
189,76	1	1	1	55,30	1	1	24,50
18,10	1	1	1	1	49,81	1	1
1	1	1	40,09	1	1	1	1
1	1	110,18	1	1	1	1	1
82,54	1	20,90	30,60	1	1	1	1

Apêndice D – Dados originais da produção e quantificação de IL-1 β em pg/mL

MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
1	1	1	11,90	3,85	1	1	1
9,18	1	9,18	30,80	1	1	1	1
1	53,21	1	1	38,80	72,73	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	28,90
1	1	1	1	1	1	1	135,60
1	1	4,38	7,58	0,64	1	1	1
1	1	1	1	30,80	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1

Apêndice E – Estatística descritiva da citotoxicidade dos cimentos em 1 e 24 horas

	Controle	MCA 1 h	MCA 24 h	MCS 1 h	MCS 24 h	MCP 1 h	MCP 24 h
Tamanho da amostra	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	80,35	71,96	72,62	39,07	90,50	48,34	101,32
Máximo	109,27	112,58	113,02	126,93	127,15	109,49	137,52
Amplitude Total	28,91	40,61	40,39	87,85	36,64	61,14	36,20
Mediana	101,65	94,03	109,60	94,48	113,90	76,60	121,85
Primeiro Quartil (25%)	98,95	86,58	107,34	61,31	100,55	56,29	106,12
Terceiro Quartil (75%)	107,17	106,95	111,53	108,27	119,15	100,71	135,09
Desvio Interquartilico	8,22	20,36	4,19	46,96	18,59	44,42	28,97
Média Aritmética	100	94,66	103,93	86,35	110,41	78,21	120,49
Variância	111,65	242	240,25	1169,49	197,19	692,75	266,62
Desvio Padrão	10,56	15,55	15,50	34,19	14,04	26,32	16,32
Erro Padrão	4,31	6,35	6,32	13,96	5,73	10,74	6,66
Coeficiente de Variação	10,57%	16,43%	14,91%	39,60%	12,72%	33,65%	13,55%
Assimetria (g1)	-1,56	-0,30	-2,33	-0,45	-0,44	0,12	-0,16
Curtose (g2)	2,79	-1,24	5,56	-1,41	-1,33	-2,06	-2,27
Média Harmônica	98,94	92,42	101,41	72,40	108,85	70,73	118,61
N (média harmônica)	6	6	6	6	6	6	6
Média Geométrica	99,49	93,55	102,78	79,66	109,64	74,42	119,55
N (média geométrica)	6	6	6	6	6	6	6
Variância (geom.)	1	1,01	1,01	1,09	1	1,05	1
Desvio Padrão (geom.)	1,11	1,18	1,18	1,59	1,13	1,41	1,14

Apêndice F – Estatística descritiva da produção e quantificação de MMP-1

	MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
Tamanho da amostra	9	9	9	9	9	9	9	9
Mínimo	2,18	2,41	2,18	2,02	1,94	2,41	1,24	2,10
Máximo	3,27	3,04	3,75	2,88	3,41	3,19	3,46	3,29
Amplitude Total	1,09	0,63	1,57	0,86	1,47	0,78	2,22	1,19
Mediana	2,80	2,80	2,86	2,41	2,41	2,57	2,88	2,80
Primeiro Quartil (25%)	2,57	2,57	2,52	2,31	2,28	2,57	2,52	2,52
Terceiro Quartil (75%)	2,80	2,86	3,04	2,81	2,81	2,83	3,11	3,19
Desvio Interquartilico	0,23	0,29	0,52	0,50	0,53	0,26	0,59	0,67
Média Aritmética	2,71	2,71	2,83	2,48	2,54	2,70	2,69	2,83
Variância	0,10	0,04	0,21	0,08	0,23	0,06	0,44	0,16
Desvio Padrão	0,32	0,20	0,46	0,29	0,48	0,26	0,66	0,40
Erro Padrão	0,10	0,06	0,15	0,09	0,16	0,08	0,22	0,13
Coeficiente de Variação	12,05%	7,71%	16,42%	12,08%	18,89%	9,71%	24,65%	14,24%
Assimetria (g1)	0,08	-0,01	0,72	0,03	0,74	0,97	-1,32	-0,55
Curtose (g2)	0,04	-1,16	0,76	-1,14	-0,28	-0,14	2,29	-0,43
Média Harmônica	2,68	2,69	2,76	2,44	2,46	2,68	2,47	2,77
N (média harmônica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Média Geométrica	2,69	2,70	2,80	2,46	2,50	2,69	2,59	2,80
N (média geométrica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Variância (geom.)	1	1	1,01	1	1,01	1	1,04	1
Desvio Padrão (geom.)	1,12	1,08	1,17	1,12	1,20	1,09	1,36	1,16

Apêndice G – Estatística descritiva da produção e quantificação de TNF- α

	MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
Tamanho da amostra	9	9	9	9	9	9	9	9
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	318,73	211,71	110,18	40,09	55,30	49,81	99,20	143,11
Amplitude Total	317,73	210,71	109,18	39,09	54,30	48,81	98,20	142,11
Mediana	18,10	1	1	1	1	1	1	1
Primeiro Quartil (25%)	1	1	1	1	1	1	1	1
Terceiro Quartil (75%)	139,80	78,5	1	1	1	1	1	24,50
Desvio Interquartilico	138,80	77,50	0	0	0	0	0	23,50
Média Aritmética	83,65	41,80	15,34	8,63	10,46	9,14	12,19	23,74
Variância	12662,11	5207,82	1308,12	234,99	387,09	298,18	1065,32	2202,46
Desvio Padrão	112,52	72,16	36,16	15,32	19,67	17,26	32,63	46,93
Erro Padrão	37,50	24,05	12,05	5,10	6,55	5,75	10,87	15,64
Coeficiente de Variação	134,51%	172,64%	235,74%	177,58%	187,97%	188,81%	267,75%	197,65%
Assimetria (g1)	1,33	1,96	2,82	1,72	1,98	2,11	2,99	2,54
Curtose (g2)	1,10	3,86	8,13	1,42	3,12	3,97	8,98	6,73
Média Harmônica	2,20	1,49	1,27	1,27	1,27	1,27	1,23	1,48
N (média harmônica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Média Geométrica	13,25	4,79	2,36	2,20	2,29	2,21	1,91	3,73
N (média geométrica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Variância (geom.)	17,67	11,39	3,82	2,91	3,28	2,97	2,79	5,95
Desvio Padrão (geom.)	13,08	10,66	5,79	4,80	5,22	4,87	4,65	7,59

Apêndice H – Estatística descritiva da produção e quantificação de IL-1 β

	MCAi	MCA	MCSi	MCS	MCPi	MCP	Controle i	Controle
Tamanho da amostra	9	9	9	9	9	9	9	9
Mínimo	1	1	1	1	0,64	1	1	1
Máximo	9,18	53,21	9,18	30,80	38,80	72,73	1	135,60
Amplitude Total	8,18	52,21	8,18	29,80	38,16	71,73	0	134,60
Mediana	1	1	1	1	1	1	1	1
Primeiro Quartil (25%)	1	1	1	1	1	1	1	1
Terceiro Quartil (75%)	1	1	1	7,58	3,85	1	1	1
Desvio Interquartilico	0	0	0	6,58	2,85	0	0	0
Média Aritmética	1,90	6,80	2,28	6,25	8,78	8,97	1	19,05
Variância	7,43	302,87	7,93	100,22	222,41	571,68	0	1995,19
Desvio Padrão	2,72	17,40	2,81	10,01	14,91	23,91	0	44,66
Erro Padrão	0,90	5,80	0,93	3,33	4,97	7,97	0	14,88
Coefficiente de Variação	142,84%	255,89%	123,32%	160,09%	169,71%	266,56%	0%	234,41%
Assimetria (g1)	3	3	2,31	2,25	1,68	3	---	2,781
Curtose (g2)	9	9	5,20	5,25	1,21	9	---	7,89
Média Harmônica	1,10	1,12	1,22	1,44	1,30	1,12	1	1,27
N (média harmônica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Média Geométrica	1,27	1,55	1,50	2,41	2,42	1,61	1	2,50
N (média geométrica)	9	9	9	9	9	9	9	9
Variância (geom.)	1,26	2,14	1,35	2,25	2,97	2,42	1	4,52
Desvio Padrão (geom.)	2,09	3,76	2,30	3,93	4,87	4,17	1	6,45

ANEXO

ANEXO A

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PROTOCOLO nº 02/04
PARECER nº 02/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa –
Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa
*“Efeito do laser em baixa intensidade na liberação de citocinas por macrófagos em
contato com cimentos endodônticos”*, sob responsabilidade da pesquisadora Lorena
Ribeiro de Sousa, sob orientação da Profa. Dra. Márcia Martins Marques.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa
após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou
“disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 10 de fevereiro de 2004

Prof. Dr. **CELSONO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP