ALINE PEREIRA OLIVEIRA

**Influência de medicações intracanal utilizadas em procedimentos
endodônticos regenerativos na sobrevivência de células
da papila apical *in vitro***

São Paulo

2014

ALINE PEREIRA OLIVEIRA

**Influência de medicações intracanal utilizadas em procedimentos
endodônticos regenerativos na sobrevivência de células
da papila apical *in vitro***

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

São Paulo

2014

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

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

Oliveira, Aline Pereira.

Influência de medicações intracanal utilizadas em procedimentos endodônticos regenerativos na sobrevivência de células da papila apical *in vitro*/ Aline Pereira Oliveira ; orientador Celso Luiz Caldeira. -- São Paulo, 2014.

91 p. : fig.; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Medicação endodôntica intracanal. 2. Sobrevivência celular. 3. Papila dentária. I. Caldeira, Celso Luiz. II. Título.

Oliveira AP. Influência de medicações intracanal utilizadas em procedimentos endodônticos regenerativos na sobrevivência de células da papila apical *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: /   /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Sônia e José, de quem recebi
um amor imensurável e incondicional, os principais
responsáveis pelos princípios e valores que adquiri!

Ao meu marido Renan pelo amor, companheirismo,
paciência e apoio em todos os momentos.

Ao meu filho Lucas, ainda em meu ventre,
o meu maior tesouro. Amor infinito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar o meu caminho e me conduzir de maneira brilhante sem me desamparar se quer por um momento;

Aos meus pais, Sônia e José, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida com muito amor, carinho e dedicação. Amo vocês infinitamente;

Ao meu marido Renan, grande amor da minha vida, pelo amor, paciência, apoio em tantos momentos difíceis;

Ao meu irmão Alisson, meu grande amigo, com quem compartilho momentos alegres e tristes, o meu grande incentivador sempre, afinal sou seu presente de aniversário de sete anos! À minha cunhada Patrícia e aos meus sobrinhos Giovanna e Lorenzo sempre tão presentes;

Ao meu irmão Alex, sempre sereno e muito objetivo, qualidade esta que sempre almejo e que ele exerce com tanta facilidade, obrigada pelos conselhos muito sábios e válidos sempre. À minha cunhada Gilmara pela amizade e sobrinha Isabella, pelo intenso carinho;

Às minhas tias Suzana, Lola e Maria, sempre muito preocupadas com o meu bem estar e com meu nome sempre presente em suas orações;

Às minhas grandes amigas Amanda, Laís, Nágila e Ana Laura, amizades que vou levar para o resto da vida, vocês foram essenciais, fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui, sempre presentes, seja com uma frase de incentivo, uma gíria paraense, uma história engraçada, um desabafo ou até mesmo um abraço acolhedor. Amo vocês do fundo do coração!

Aos meus amigos pós graduandos e estagiários Alexandre, Elaine, Vitor, Cléber, Laila, Márcia, Edgar, Alessandra, Valéria e Leonardo, pela convivência e apoio sempre;

Ao meu orientador professor Dr. Celso Luiz Caldeira pela oportunidade de trabalhar contigo, pela assistência, conhecimentos concedidos e pela amizade;

À minha co-orientadora professora Dr(a). Carla Renata Sipert por todo o empenho neste trabalho desde o início, por quem fui treinada no laboratório de cultura celular e com quem adquiri todo o conhecimento nesta linha de pesquisa, a qual me apaixonei.

Ao professor Dr. Giulio Gavini, pelas aulas e seminários que contribuíram de maneira relevante na confecção desta dissertação, assim como por todo o conhecimento em Endodontia direcionado;

Ao professor Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado pelos anos de convivência na graduação no período noturno e por conceder a primeira oportunidade de ministrar uma aula em minha cidade natal Catanduva;

À professora Dr(a). Márcia Martins Marques, por permitir o uso de seu laboratório e contribuir com seu conhecimento, fundamental para a conclusão de minha pesquisa;

À turma do Laboratório de pesquisa Básica do Departamento de Dentística: funcionária Débora e todos os alunos: Renata, Rejane, Sueli, Sttela, Sttelinha, Fabi, Paula, Ana Clara, Gabriela e Mari pela companhia e pela troca de conhecimentos para aprimorar esta pesquisa;

Aos funcionários do Departamento de Dentística: Selma, sempre muito solícita, Aldo e Arnaldo (Paixão) sempre muito alegres, bem humorados e muito prestativos;

Às funcionárias da biblioteca: Glauci, Vânia e Cláudia pela eficiência e por toda a paciência;

Ao Marcos (xerox) sempre muito prestativo e eficiente.

"As palavras só têm sentido se nos ajudam a ver o mundo melhor.
Aprendemos palavras para melhorar os olhos."

"Há muitas pessoas de visão perfeita que nada vêem...
O ato de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"

Rubem Alves

RESUMO

Oliveira AP. Influência de medicações intracanal utilizadas em procedimentos endodônticos regenerativos na sobrevivência de células da papila apical *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Procedimentos endodônticos regenerativos proporcionaram mudanças no tratamento de pacientes com dentes imaturos e periodontite apical possibilitando desenvolvimento radicular completo e menor incidência de fratura dental. Medicações intracanal são utilizadas para a realização da desinfecção; entretanto, o efeito delas sobre as células da papila apical é pouco elucidado. Adicionalmente, pouco se conhece a respeito do efeito destas substâncias sobre células previamente submetidas à condição pró- inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de medicações intracanal empregadas em procedimentos regenerativos em Endodontia sobre células de papila humana em cultura em condição fisiológica e ativada. Cultura de células foi estabelecida a partir da papila apical removida de um terceiro molar imaturo extraído. As substâncias estudadas foram a pasta tripla antibiótica modificada: ciprofloxacina, metronidazol e cefalosporina (1:1:1); CFC: ciprofloxacina, metronidazol e hidróxido de cálcio (1:1:2) e CFC modificado: ciprofloxacina, metronidazol e hidróxido de cálcio (2:2:1). Parte das células foram estimuladas previamente por ácido lipoteicoico (LTA) de *Enterococcus faecalis* por 7 dias. Após plaqueamento, células foram expostas a concentrações crescentes das medicações por 1, 3, 5 e 7 dias. Foram avaliados viabilidade celular por meio de brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e liberação de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância a 1 critério (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O CFC modificado foi a medicação que demonstrou menor efeito citotóxico sobre a viabilidade celular nos tempos experimentais estudados, o CFC promoveu queda da viabilidade celular especialmente após 7 dias de contato. A pasta tripla antibiótica modificada resultou em comprometimento importante da viabilidade podendo ser considerada a mais citotóxica. A ativação celular por LTA resultou em níveis aumentados de atividade mitocondrial para todas as medicações sendo mais evidente nos períodos experimentais mais longos. A ativação celular também contribuiu para níveis maiores de óxido nítrico. Conclui-se que o efeito citotóxico das medicações testadas é

dependente de sua concentração, tempo de contato e condição celular, sendo a pasta tripla antibiótica modificada a mais citotóxica em concentrações elevadas podendo implicar clinicamente na diminuição da viabilidade das células da papila apical podendo diminuir o sucesso dos procedimentos regenerativos.

Palavras chave: Sobrevivência celular. Papila dentária. Endodontia.

ABSTRACT

Oliveira AP. Influence of intracanal medications used in regenerative endodontic procedures on survival of apical papilla cells in vitro [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Regenerative Endodontic procedures have provided changes in treatment of patients with immature teeth and apical periodontitis enabling full root development and lower incidence of dental fracture. Intracanal dressings are used for disinfection; however, their effect on apical papilla cells is poorly elucidated. Additionally, the effect of these substances on cells previously subjected to proinflammatory condition is still unknown. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of intracanal dressings used in Endodontics regenerative procedures on cultured human apical papilla cells at physiologic and activated condition. Cell culture was established from the apical papilla removed from an extracted immature third molar. The substances studied were triple antibiotic modified paste: ciprofloxacin, metronidazole and cephalosporin (1:1:1); CFC: ciprofloxacin, metronidazole and calcium hydroxide (1:1:2) and modified CFC: ciprofloxacin, metronidazole and calcium hydroxide (2:2:1). Part of the cells was stimulated previously with lipoteichoic acid (LTA) of *Enterococcus faecalis* for 7 days. Once plated, cells were exposed to increasing concentration of the medications for 1, 3, 5 and 7 days. Cell viability was evaluated by means of 3-bromide (4,5-dimethylazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole (MTT) and Nitric Oxide (NO) release was assessed by the Griess method. The statistical analysis was done through analysis of variance with 1 criteria (ANOVA) followed by Tukey test with 5% of significance level. Modified CFC was the medication that demonstrated the less cytotoxic effect on cell viability at the experimental periods studied while CFC promoted significant decrease on cell viability specially after 7 days of contact. The modified triple antibiotic paste resulted in important alteration of cell viability being considered the most cytotoxic. Cellular activation by LTA resulted in increased levels of mitochondrial activity for all medications being more evident at the longer experimental periods. Cellular activation also contributed to higher levels of nitric oxide release. In conclusion, the cytotoxic effect of the tested medications is dependent on concentration, time of contact and cellular condition, being the triple antibiotic modified paste the most cytotoxic in high concentrations leading clinically in the decreased of the cells viability of the apical papilla, decreasing the success of regenerative procedures.

Keywords: Cell survival. Dental papila. Endodontics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Dental Association – Associação Dental Americana
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
BSP	bone sialoprotein
CEM	mistura enriquecida de cálcio
CFC	ciprofloxacina - flagyl – hidróxido de cálcio
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DMP-1	dentin matrix protein- 1
DPSCs	células da polpa dental
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
et al.	e colaboradores
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
iNOS	Inducible nitric oxide synthase – síntase de óxido nítrico induzido
IRM	material restaurador intermediário
LPS	lipopolissacarídeo
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> – ácido lipoteicóico
MOD	CFC modificado

MTA	<i>Mineral Trioxide Aggregate</i> – Agregado de trióxido mineral
MTAD	tiosulfato 3%, ácido cítrico 4,25% e detergente Polisorbato 0,5%
MTT	3-bromide (4.5-dimetiltiazol-2-yl) -2.5-difeniltetrazólio – 3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	fosfato denucleotídeo adenina nicotinamida
nm	nanômetros
NaNO ₂	nitrito de sódio
NaOCl	hipoclorito de sódio
NED	cloreto de N-(1-naftilenodiamino)
NF-κB	factor nuclear kappa B – fator nuclear kappa B
NK	células <i>natural Killer</i>
NO	<i>nitric oxide</i> – óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NOS	<i>nitric oxide synthase</i> - óxido nítrico sintase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão fosfato salina
PRP	plasma rico em plaquetas
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – ácido ribonucleico
REPs	regenerative endodontic procedures –procedimentos endodônticos regenerativos
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – espécies reativas de oxigênio
SBF	soro bovino fetal
SCAPs	células da papila apical

TA	temperatura ambiente
TAP mod	pasta tripla antibiótica modificada
TLR	<i>Toll-like receptor</i> – receptor do tipo <i>Toll</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> – Fator de crescimento transformador
TN- α	fator de necrose tumoral
TRE	regenerative endodontic therapy- terapia endodôntica regenerativa
VBNC	viable but nonculturable - viável mas não cultivável
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> – Fator de crescimento vascular endotelial
μg	micrograma
μM	micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA.....	21
2.2 TÉCNICAS EMPREGADAS	24
2.2.1 Descontaminação passiva.....	24
2.2.2 Substâncias químicas.....	25
2.2.3 Medicamentos intracanal	26
2.2.4 Número de sessões.....	30
2.2.5. Scaffold- coágulo sanguíneo	31
2.2.6 Selamento	32
2.3 CITOTOXICIDADE DAS MEDICAÇÕES SOBRE CÉLULAS DA PAPILA APICAL	33
2.4 CONDIÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA.....	36
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.2 COLETA DO TECIDO E ESTABELECIMENTO CULTURA PRIMÁRIA.....	41
4.3 PREPARO DOS MEDICAMENTOS	42
4.4 CONDICIONAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO E DILUIÇÃO SERIADA	43
4.5 PLAQUEAMENTO E ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS DE PAPILA APICAL COM AS MEDICAÇÕES INTRACANAL	44
4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.7 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE POR MTT	45
4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	46
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS	47
5.1 CITOTOXICIDADE DAS MEDICAÇÕES SOBRE CÉLULAS DA PAPILA APICAL	47
5.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS DA PAPILA APICAL EM CONTATO COM AS MEDICAÇÕES INTRACANAL	56
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

O trauma dentário, considerado um problema de saúde pública mundial, é o grande responsável por lesões à estrutura do periodonto e polpa que podem provocar danos a função do sistema estomatognático e estética, além de causar problemas psicológicos ao paciente.

As principais alterações pulpare decorrentes do traumatismo referem-se à mortificação pulpar, calcificação e reabsorção radicular. A necrose é a mais frequente e a faixa etária prevalente é composta por jovens em desenvolvimento. Sendo assim, a formação radicular pode ser comprometida se houver algum dano à papila apical. A formação radicular decorre de estímulos provindos da bainha epitelial de Hertwig sobre odontoblastos viáveis de um dente com rizogênese incompleta (Zeichener et al., 2003). Agressões ao tecido pulpar em dentes em desenvolvimento ocasionam interrupção da formação radicular e consequente condição anatômica desfavorável para a funcionalidade e para o tratamento endodôntico convencional. Portanto, preconizam-se tratamentos com indução do coágulo que visem o aumento da espessura radicular até o fechamento da abertura apical, por meio da prevenção de invasão microbiana ou eliminação de infecção existente (Whittle, 2000).

O tratamento de dentes imaturos com periodontite apical sempre foi um grande desafio na Odontologia. Resultantes de cárie ou trauma, o comprometimento pulpar leva à interrupção do desenvolvimento radicular deixando suas paredes radiculares finas e frágeis, com ápice aberto e susceptíveis à fratura.

O tratamento Endodôntico convencional se baseia em procedimentos que têm como objetivo eliminar a infecção existente e prevenir a invasão microbiana, com trocas constantes de hidróxido de cálcio para posterior formação de uma barreira calcificada (apicificação). No entanto, para formação da barreira apical, são necessárias múltiplas trocas prolongando o tempo de tratamento que pode levar à alteração de propriedades mecânicas da dentina, deixando as paredes do canal susceptíveis à fratura, além da barreira ter consistência porosa e não contínua. O canal fica susceptível à reinfecção por ser coberto por um selamento temporário e pelo longo tempo de tratamento.

Além dessa técnica, outros métodos têm sido descritos como a barreira apical artificial de Agregado de Trióxido Mineral (MTA) para facilitar a posterior obturação do canal radicular. Esta técnica, que surgiu como alternativa à técnica clássica de apicificação, tem como principal vantagem o fato de ser realizada em poucas sessões permitindo a breve finalização do tratamento.

A desvantagem de ambos tratamentos mencionados é que nenhum deles resulta em espessamento das paredes radiculares e no desenvolvimento contínuo da raiz. Estes fatores são de grande importância, uma vez que 60% de todos os dentes tratados endodonticamente com rizogênese incompleta sofrem fraturas radiculares (Trope; Ray, 1992).

A terapia endodôntica regenerativa (TRE) definida pela Associação Americana de Endodontia como procedimentos com base biológica designados a reparar danos estruturais, incluindo dentina e estruturas radiculares, bem como células do complexo dentina-polpa, fornece um tratamento alternativo com princípios da medicina regenerativa e da engenharia tecidual.

Para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos (REPs) são necessários três fatores importantes: a desinfecção do canal radicular, uma matriz para a condução da proliferação celular e um bom selamento do acesso coronário. É fundamental que os microrganismos no interior dos canais radiculares sejam reduzidos ao mínimo por meio de substâncias irrigadoras e medicação intracanal ao mesmo tempo em que as células da papila sobrevivam ao tratamento antisséptico.

O protocolo introduzido por Banchs e Trope (2004) envolve o uso de uma medicação intracanal utilizada para realizar a antisepsia do canal radicular e a indução de sangramento para criar uma matriz: o coágulo, para o crescimento interno de tecido novo vital no espaço do canal radicular. Células-tronco provenientes de remanescentes vitais pulpares, da papila apical e do ligamento periodontal têm sido sugeridos como os responsáveis pela formação do tecido (Huang et al., 2008). Os resultados clínicos dos procedimentos endodônticos regenerativos são favoráveis, incluindo aumento da espessura e extensão radicular e remissão do quadro clínico infeccioso.

Vários relatos de caso e alguns estudos clínicos demonstraram resultados promissores dessa terapia em dentes com rizogênese incompleta, diferindo entre os

protocolos a medicação intracanal utilizada, substâncias irrigadoras, dentre outros. É de grande importância avaliar não somente a eficácia antimicrobiana dessas medicações, mas também a citotoxicidade das pastas sobre as células da papila apical.

Há estudos *in vitro* que avaliam a citotoxicidade de substâncias sobre células de papila analisando o efeito das medicações sobre células em condição de homeostasia (Ruparel et al., 2012; Chuensombat et al., 2013). Entretanto, em quadros de periodontite apical em dentes com rizogênese incompleta, as células da papila que eventualmente tenham sobrevivido se encontram em um ambiente pró-inflamatório resultante da presença de microrganismos na cavidade pulpar e de mediadores inflamatórios liberados por células da polpa, da própria papila ou dos tecidos periapicais. Sendo assim, este estudo avaliará a susceptibilidade de células de papila apical a medicações intracanal previamente submetidas a condição pró-inflamatória.

As pastas medicamentosas utilizadas para os REPs geralmente incluem antibióticos (como cefalosporina, minociclina, ciprofloxacino e metronidazol) e antimicrobianos (como o hidróxido de Cálcio). Os primeiros utilizados rotineiramente em quadros de dentes com formação completa e infecção persistente (Masiero et al., 2010) e os segundos em situações para indução de mineralização, na inativação de endotoxina ou hidrólise do LPS (Mohammadi; Dummer, 2011, Safavi; Nichols, 1993).

A associação de ambas parece promissora como medicação intracanal em dentes imaturos e principalmente na assepsia dos canais que serão submetidos ao procedimento regenerativo.

Diante do exposto, tendo em vista a constante busca pela medicação intracanal mais apropriada, capaz de promover antissepsia e apresentar baixa citotoxicidade, há que se estudar o efeito desses materiais em condição pró-inflamatória, assim como avaliar materiais que possam ser promissores como medicação intracanal em dentes imaturos com periodontite apical. Neste contexto, há que se testar o efeito de materiais que associados possam somar ou potencializar características físicas, químicas e biológicas fundamentais na Endodontia regenerativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Dentro da Endodontia a terapia regenerativa vem como uma alternativa de tratamento que permite que dentes imaturos com periodontite apical sofram aumento de espessura de paredes e do seu comprimento diminuindo a incidência de fratura e perda do elemento dental, assunto de grande relevância que merece ser explorado.

2.1 TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA

A terapia regenerativa surgiu como uma alternativa promissora com dois conceitos que se enquadram no tratamento de dentes não vitais (Bansal; Bansal, 2011). O primeiro refere-se à regeneração pulpar, no qual se estuda o desenvolvimento de novo tecido pulpar *in vitro* a partir de células indiferenciadas estimuladas por fatores de crescimento, com o objetivo de regenerar o tecido pulpar perdido (Zhang; Yelick, 2010; Neha et al., 2011; Bansal; Bansal, 2011). O segundo conceito pode ser definido como a invaginação de células indiferenciadas da região apical de dentes de pacientes jovens com ápice aberto (Zhang; Yelick, 2010). Acredita-se que essas células indiferenciadas possam sobreviver à necrose pulpar, mesmo na presença de infecção perirradicular (Huang et al., 2008).

Este conceito iniciou em pesquisas das décadas de 50 e 60 com um enfoque diferente da atualidade. Os estudos abordavam dentes reimplantados ou transplantados em que eram avaliados a revascularização do compartimento radicular contendo tecido pulpar isquêmico e puderam observar a ocorrência de revascularização desse tecido após 48 horas por meio de um fenômeno chamado embebição plasmática (Hale, 1954; Myers; Flanagan, 1958; Pafford, 1956). Nygaard-Ostby (1961) em estudo histológico em cães observou que após a desinfecção do canal radicular, a presença de sangramento com a formação do coágulo sanguíneo foi essencial para a formação de tecido conjuntivo fibroso no canal vazio. Esses estudos foram relevantes para que a partir do ano 2000, a terapia endodôntica regenerativa (TRE) pudesse ser estudada como uma alternativa à apicificação.

A revascularização com continuação do desenvolvimento radicular e deposição de tecido duro no canal radicular é observada muitas vezes quando um dente é reimplantado após a avulsão (Cvek, 1992) no qual ocorre disputa pelo espaço pulpar entre o tecido apical e os microrganismos (Ohman, 1965). Os fatores importantes para isso ocorrer são: o tempo extraoral e o nível de maturação radicular. Quanto menor o tempo exposto fora da boca, menores as chances de contaminação, tendo melhores chances das células se manterem vitais, quanto maior a largura do forame, maiores as chances de ocorrer o restabelecimento do feixe vaso-nervoso (Skoglund; Trontad, 1981).

Banchs e Trope (2004) introduziram um protocolo de revascularização como uma alternativa promissora, baseando-se nas idéias precursoras sobre a importância do coágulo retratado por Ostby e no restabelecimento da vascularização que ocorre no reimplante dentário após a avulsão. Concluíram que o mesmo poderia ocorrer criando um ambiente favorável: se o canal for efetivamente desinfetado, uma matriz para o crescimento do tecido novo for formada e o acesso coronário efetivamente selado para prevenção de uma reinfecção.

Nesta nova proposta de tratamento, Banchs e Trope (2004), em dente com extensa lesão periapical, utilizaram substâncias irrigadoras e uma pasta composta por três antibióticos para a realização da desinfecção e estimulação do reparo apical e em uma segunda sessão estimularam o sangramento, aguardaram a formação de um coágulo e o dente foi selado; observou-se que após 24 meses houve o desenvolvimento radicular completo e ausência da lesão periapical. Embora a origem do tecido formado dentro do canal radicular não fosse conhecida, eles acreditavam nos benefícios trazidos pelo procedimento que permitem aumento da espessura das paredes radiculares e do comprimento radicular. Trata-se ainda de ser uma técnica simples, que não exige altos custos e é realizada com materiais facilmente disponibilizados na rotina clínica (Murray et al., 2007).

Wang et al. (2010) avaliaram por meio de análise histológica o tipo de tecido formado após procedimentos endodônticos regenerativos em cães e concluíram que o espaço pulpar é formado por tecido duro semelhante a cimento, somente em um caso foi observado tecido pulpar parcialmente vital, porém são necessários mais estudos histológicos para avaliação do tecido formado. Gomes-Filho et al., 2013 também observaram formação de cimento na cavidade pulpar de dentes

previamente infectados. Pelo fato de não estar claro o tipo de tecido formado, o termo usado para tais procedimentos é muito discutido. Os termos mais utilizados são: regeneração, revitalização e revascularização. O termo revascularização descreve o restabelecimento de suprimento vascular com o tecido pulpar existente em dentes permanentes imaturos (Simon et al., 2007), Revitalização descreve o crescimento de tecido que pode não ser semelhante ao tecido perdido (Wang et al., 2010) e terapia endodôntica regenerativa se refere ao restabelecimento de estruturas que sofreram danos, incluindo dentina e estruturas radiculares, bem como células do complexo dentino-pulpar (Murray et al., 2007).

Trope escolheu o termo revascularização, não por ser um termo preciso, mas por não saber a natureza do tecido formado e por ter a certeza que esse tecido tem um suprimento sanguíneo, portanto afirma ser vascularizado (Trope, 2010), porém mais recentemente sugeriu que o termo revitalização seria mais apropriado por descrever um tecido vital não específico formado no canal radicular (Lenzi; Trope, 2012).

O termo geração tecidual guiada ou induzida e regeneração foi sugerido por Huang e Lin (2008) que discordam do termo revascularização.

Hargreaves et al. (2008) deixaram de usar o termo revascularização para o uso de procedimentos endodônticos regenerativos, justificando que o objetivo do tratamento é regenerar o complexo dentina polpa com propriedades funcionais que são capazes de dar suporte a continuação do desenvolvimento radicular, enquanto soluciona a periodontite apical.

Portanto não há um consenso a respeito do termo utilizado, o que futuramente deverá ser padronizado pela Associação Americana de Endodontia, que em suas publicações nomeia os protocolos como procedimentos endodônticos regenerativos.

Há algumas sugestões na literatura em relação ao mecanismo de ação da TRE. Sugere-se que células pulpares vitais possam sobreviver na porção apical da raiz, as quais podem proliferar sobre a matriz formada: coágulo dentro do canal radicular e se diferenciar em odontoblastos sob estímulo das células dos restos epiteliais de Mallassez (Banchs; Trope, 2004). A segunda possibilidade sugere que células mesenquimais indiferenciadas podem ser abundantes no tecido pulpar

necrótico de dentes com rizogênese incompleta, as quais podem se aderir às paredes radiculares internas e se diferenciar em odontoblastos que secretariam dentina nesta região (Gronthos et al., 2002). Outra possibilidade poderia ser atribuída à presença de células mesenquimais indiferenciadas no ligamento periodontal, as quais podem proliferar na porção apical e se diferenciar em cementoblastos e depositar tecido mineralizado nas paredes dentinárias (Lieberman; Trowbridge, 1983). E por último poderia ser atribuído às células mesenquimais indiferenciadas remanescentes da papila apical, polpa dentária, ligamento periodontal e osso alveolar, as quais quando estimuladas com um instrumento além da extensão do canal radicular por possuírem alta capacidade proliferativa, podem formar tecido mineralizado dentro do canal radicular (Lovelace et al., 2011).

2.2 TÉCNICAS EMPREGADAS

É de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos a presença da tríade: células tronco, “scaffolds” que provêm um suporte para a organização, proliferação, diferenciação e vascularização celular e os fatores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras (AAE, 2013).

As técnicas empregadas: uma ou mais sessões, tipo de irrigante, pasta antibiótica, barreira colocada no espaço pulpar e os períodos de retorno variam, mas todos seguem os princípios da desinfecção do canal radicular, criação de um ambiente para o crescimento das células tronco e a inserção de um selamento coronário (Law, 2012).

2.2.1 Descontaminação passiva

A antissepsia é um passo fundamental no tratamento endodôntico, para ser realizada é necessária a utilização de substâncias químicas auxiliares e instrumentação mecânica (Bystrom; Sundqvist, 1981). Porém, para dentes imaturos

a remoção de microrganismos por meios mecânicos é limitada devido à fina espessura das paredes dentinárias fazendo com que a limpeza seja obtida por meio de irrigação e medicação intracanal (Zhang; Yelick, 2010).

2.2.2 Substâncias químicas

O hipoclorito de sódio é a mais utilizada mundialmente (Clarkson; Moule, 1998). De acordo com a literatura, o NaOCl apresenta propriedades antimicrobianas contra os principais patógenos endodônticos (Bystrom; Sudqvist, 1985) e pode ser utilizado em várias concentrações: 0,5 a 6%.

A clorexidina também é utilizada nas concentrações de 2 e 0,12%, apesar das propriedades antimicrobianas satisfatórias, estas substâncias não são biocompatíveis, podendo inviabilizar as células-tronco presentes no tecido pulpar impedindo as mesmas de se aderirem à superfície dentinária intraradicular (Ring et al., 2008).

Na grande maioria dos casos relatados foram utilizadas concentrações elevadas de hipoclorito de sódio. Reynolds et al. (2009), Shin et al. (2009) e Nagata et al. (2014a,b) utilizaram hipoclorito de sódio a 6% associado a soro e clorexidina 2%, Iwaya et al. (2001); Cotti et al. (2008) e Iwaya et al. (2011), utilizaram NaOCl 5% associado a peróxido de hidrogênio 3%. Banchs e Trope (2004), Petrino (2007) e Petrino et al. (2010) utilizaram NaOCl 5,25% associado a clorexidina 0,12%. Jung et al. (2008), Ding et al. (2009), Chen et al. (2012), Nosrat et al. (2011); Torabinejad e Turman (2011) e Nosrat et al. (2012), utilizaram somente NaOCl 5,25% na grande maioria de seus casos. Chueh e Huang (2006), Jung et al. (2008), Chueh et al. (2009), Cehreli et al. (2011), Lenzi e Trope (2012) e Jeeruphan et al. (2012) utilizaram NaOCl 2,5%. Shah et al. (2008) utilizaram NaOCl 2,5% associado peróxido de hidrogênio 3%. Thibodeau e Trope (2007) e Thibodeau (2009) utilizaram NaOCl 1,25%. Thomson e Kahler (2010) fizeram uso de NaOCl 1% com auxílio de ultrassom.

Além do uso de substâncias químicas auxiliares, faz-se necessário também o uso de agentes quelantes para a remoção da smear layer sendo os mais comuns o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o ácido cítrico e MTAD®. Essa última é

composta por solução de tiosulfato 3%, ácido cítrico 4,25% e o detergente polisorbato 0,5%, utilizada por Torabinejad et al. (2003). O EDTA é capaz de liberar vários fatores de crescimento presentes na matriz dentinária (Graham et al., 2006), portanto é indicado seu uso pela American Association of Endodontics (AAE, 2013).

2.2.3 Medicações intracanal

Este estudo tem estreita relação com esse tópico, já que se propôs a avaliar algumas medicações intracanal em relação à citotoxicidade sobre células da papila apical. As medicações utilizadas devem ter efeito antibacteriano suficiente para eliminar os agentes agressores, no entanto não podem comprometer a viabilidade destas células (Law, 2013).

A infecção de dentes com rizogênese incompleta foi pouco estudada até o momento, entretanto parece ser bastante semelhante à de dentes completamente formados, ou seja, com presença principal de anaeróbios estritos produtores de pigmento negro e poucos anaeróbios facultativos (Baumotte et al., 2011). Considerando a importância da redução microbiana e do perfil polimicrobiano das infecções de canais radiculares, agentes antimicrobianos com amplo espectro de ação ou uma combinação deles se faz necessário para o alcance desse objetivo. O protocolo descrito por Hoshino et al. (1996), adotado por Banchs e Trope (2004), combina ciprofloxacina, metronidazol e minociclina em uma pasta sendo 100 µg/mL de cada componente, a qual demonstrou atuar melhor dessa forma do que quando cada componente foi utilizado separadamente, eliminando bactérias presentes mesmo nas camadas mais profundas de dentina infectada (Hoshino et al., 1996; Sato et al., 1993).

A partir destes resultados, estudos e casos clínicos sobre procedimentos endodônticos regenerativos passaram a empregar esta pasta antibiótica como “padrão-ouro” de medicação intracanal, visando conseguir o controle da infecção no interior do sistema de canais radiculares que permita a proliferação de um novo tecido e que possa dar continuidade ao desenvolvimento radicular. Os componentes podem ser manipulados na forma líquida, pó ou em pasta, na proporção 1:1:1.

Quando na forma de pó, são diluídos em água destilada, anestésico ou propilenoglicol.

A ciprofloxacina é um antibiótico de segunda geração, do grupo das quinolonas que atua nas bactérias gram negativas e gram positivas. Em geral os anaeróbios são menos susceptíveis, tem mecanismo de ação decorrente do bloqueio da função da DNA-girase, resultando em alto efeito bactericida sobre amplo espectro de microrganismos na fase proliferativa e vegetativa. A sua associação a outro antibiótico pode ter efeitos aditivos ao combate de alguns microrganismos (Anvisa, 2014a).

O metronidazol é um fármaco da família dos nitro-5-imidazóis que apresenta espectro de atividade antimicrobiana que abrange exclusivamente microrganismos anaeróbios estritos (cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos, bacilos gram-positivos), após a entrada na célula, por difusão passiva, o antimicrobiano é ativado por um processo de redução. O grupo nitro da droga atua como receptor de elétrons, levando à liberação de compostos tóxicos e radicais livres que atuam no DNA, inativando-o e impedindo a síntese proteica das bactérias (Conselho Federal de Farmácia, 2014).

A minociclina é um fármaco da família das tetraciclinas, antimicrobianos primariamente bacteriostáticos quando em concentrações terapêuticas. Apresentam amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários. As tetraciclinas entram na célula por difusão, em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese protéica (Anvisa, 2014b).

Além dos estudos *in vitro*; a ação antimicrobiana desta pasta composta por antibióticos tem sido relatada *in vivo* em estudos com cães (Windley et al., 2005; Wang et al., 2010) e estudos clínicos (Petrino, 2007; Jung et al., 2008; Shah et al., 2008; Ding et al., 2009; Reynolds et al., 2009; Kim et al., 2010; Petrino et al., 2010; Thomson; Kahler, 2010; Nosrat et al., 2011; Torabinejad; Turman, 2011; Jeeruphan et al., 2012; Lenzi; Trope, 2012; Nosrat et al., 2012).

Apesar de se mostrar eficiente, esta pasta apresenta alguns efeitos colaterais como a possibilidade de escurecimento da coroa dental devido à presença da minociclina (Kim et al., 2010), um derivado semi-sintético da tetraciclina que é eficaz contra bactérias gram- positivas e gram- negativas (Windley et al., 2005). Por isso foi proposto a sua substituição pela cefalosporina, ou somente sua remoção ou o uso de adesivos dentinários para diminuir o contato com a superfície dentinária. Assim como Thibodeau e Trope (2007) e Thibodeau (2009) fizeram em seus estudos, adicionaram a cefalosporina e obtiveram resultados semelhantes. As cefalosporinas são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, as indicadas para este tratamento são as de segunda geração, mais eficazes contra gram-negativas, atuam na parede celular do microrganismo (Anvisa, 2014c).

O desenvolvimento da resistência microbiana é outro fator relevante sobre a utilização da pasta antibiótica, porém não há estudos que comprovem que esta pasta selecione microorganismos resistentes. Sugere-se apenas que a utilização dessa pode também diminuir a probabilidade do desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes (Mohammadi; Abbott, 2009). Além das dificuldades encontradas para a efetiva remoção da pasta e a preocupação de resíduos dela serem citotóxicos para a viabilidade das células da papila apical, Berkhoff et al. (2014) mostraram que mesmo com o auxílio de diferentes técnicas de irrigação, menos de 20% da pasta tripla antibiótica foi removida, diferente da remoção do hidróxido de cálcio que foi de 85%, isso se deve a grande penetração da primeira pasta às paredes dentinárias.

Considerando as limitações da pasta composta por antibióticos, pesquisadores começaram a testar alternativas de medicações com propriedades antimicrobianas efetivas. O hidróxido de cálcio utilizado tradicionalmente nos casos de apicificação (Cvek, 1972) e muito utilizado na rotina endodôntica como medicação intracanal devido à sua propriedade antimicrobiana (Chueh; Huang, 2006) tem sido utilizado nos procedimentos endodônticos regenerativos, sendo observado sucesso clínico e radiográfico. O hidróxido de cálcio é capaz de solubilizar moléculas bioativas, inclusive fatores de crescimento da matriz de dentina humana como TGF- β 1, que por sua vez podem estimular células indiferenciadas a se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos e estes produzirem tecido mineralizado (Graham et al., 2006). Além disso o hidróxido de cálcio pode não

interferir na sobrevivência de células da bainha epitelial de Hertwig (Shimizu et al., 2013); embora, outro estudo enfatizou que esta medicação prejudicaria qualquer remanescente viável e os restos epiteliais de Malassez (Banchs; Trope, 2004).

Em contato com o tecido o hidróxido de cálcio promove necrose por coagulação (Holland, 1971), ao promover necrose, o hidróxido de cálcio transforma-se em carbonato de cálcio, cujos grânulos, em um primeiro momento atuam como núcleos de calcificação distrófica a margem da densa deposição de fibras reticulares (Holland, 1971), a partir da qual as células se diferenciam e formam a barreira mineralizada (Pereira, 2004). Em princípio, essa necrose inicial ao invés de atuar como um obstáculo parece ser fundamental para o processo de reparo (Pereira, 2004).

Relatos de casos recentes obtiveram sucesso na revascularização pulpar utilizando pastas à base de hidróxido de cálcio (Chueh; Huang, 2006; Cotti et al., 2008; Chueh et al., 2009; Cehreli et al., 2011; Iwaya et al., 2011; Neha et al., 2011; Chen et al., 2012; Nosrat et al., 2013; Soares et al., 2013; Nagata et al., 2014a,b).

Bose et al. (2009), em suas análises mostraram que tanto o hidróxido de cálcio quanto a pasta tripla antibiótica foram eficazes em auxiliar o aumento da espessura e comprimento de raízes.

Porém, Cotti et al (2008) e Chen et al (2012) observaram em alguns casos a calcificação parcial ou total decorrentes do uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, o que poderiam prejudicar uma intervenção posterior caso fosse necessário.

Shah et al. (2008), Chueh e Huang (2006) e Bose et al. (2009) utilizaram o formocresol como medicação intracanal, o que está em desuso nos trabalhos atuais. Shah et al. (2008) relataram desenvolvimento radicular completo após 6 meses. Chueh e Huang (2006) observaram o desenvolvimento radicular completo em um período que variou de 7 meses a cinco anos com aumento da espessura das paredes dentinárias. Porém, Bose et al. (2009) não observaram aumento da espessura e comprimento das raízes.

Outras medicações também são utilizadas como a amoxicilina associada ao clavulanato (Augmentin®, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC). Nosrat et

al. (2013) utilizaram a pasta como medicação intracanal e observaram resolução da lesão periapical e desenvolvimento radicular completo após 17 meses. A amoxicilina inibe a síntese da parede celular bacteriana a partir da ligação a um ou mais sítios das proteínas ligadoras de penicilinas e o ácido clavulânico liga-se de forma irreversível a betalactamases, inibindo essas enzimas bacterianas que destroem a amoxicilina; com isso, expande-se o espectro de ação antimicrobiano da penicilina, abrangendo bactérias antes resistentes à amoxicilina, por produzirem betalactamases (Anvisa, 2014d). No entanto, o uso desta medicação ainda não foi alvo de muitas publicações.

A pasta antibiótica somente composta por ciprofloxacina e metronidazol também é utilizada. Iwaya et al. (2001) obtiveram bons resultados com desenvolvimento radicular completo e maturação apical após 30 meses.

Outras medicações utilizadas nos procedimentos endodônticos regenerativos são: CFC composto por ciprofloxacino (1), metronidazol (1) e hidróxido de cálcio (2) e uma modificação do CFC composto por ciprofloxacino (2), metronidazol (2) e hidróxido de cálcio (1). Essas medicações foram incluídas no estudo juntamente com a pasta tripla modificada.

Essas medicações são muito utilizadas em infecções endodônticas persistentes no tratamento endodôntico convencional (Takeut et al., 1997; Lage-Marques; Antoniazzi, 2000; Masiero et al., 2010) e podem ser promissoras nos procedimentos endodônticos regenerativos, pois combina antibióticos citados anteriormente com alto potencial antimicrobiano ao hidróxido de cálcio também com inúmeras propriedades relatadas, que associados podem ter efeitos ainda melhores.

2.2.4 Número de sessões

A necessidade do uso de uma medicação intracanal para a desinfecção é consenso na literatura, com exceção de Shin et al. (2009) que realizaram o tratamento em uma única sessão, somente utilizando substâncias químicas para realização da antissepsia. Os autores relataram sucesso no caso com término do desenvolvimento radicular e espessamento das paredes dentinárias após 19 meses.

2.2.5 Scaffold- coágulo sanguíneo

Essencial, o coágulo sanguíneo atua como suporte para a organização celular, proliferação, diferenciação e vascularização (Bohl et al., 1998). A maioria dos protocolos propostos na literatura envolve a manipulação dos tecidos periapicais, com o objetivo de promover o sangramento para induzir a formação de um coágulo sanguíneo no espaço do canal radicular (Banchs; Trope, 2004; Chueh; Huang, 2006; Petrino, 2007; Thibodeau; Trope, 2007; Cotti et al., 2008; Jung et al., 2008; Shah et al., 2008; Ding et al., 2009; Reynolds et al., 2009; Shin et al., 2009; Thibodeau, 2009; Kim et al., 2010; Petrino et al., 2010; Thomson; Kahler, 2010; Cehreli et al., 2011; Nosrat et al., 2011; Chen et al., 2012; Jeeruphan et al., 2012; Lenzi; Trope, 2012; Nosrat et al., 2012; Soares et al., 2013; Nagata et al., 2014a,b). O coágulo ainda contribui para a migração de células indiferenciadas da papila apical ou do ligamento periodontal que atuarão na deposição de tecido mineralizado nas paredes internas do canal radicular. A relevância da presença do coágulo tem sido sugerida por alguns estudos que relataram a expressão de marcadores específicos de células indiferenciadas em coletas de sangue do canal radicular durante procedimentos endodônticos regenerativos (Lovelace et al., 2011), sugerindo que o estímulo aos tecidos apicais e a formação do coágulo podem transportar células indiferenciadas para o espaço do canal.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido sugerido como um “scaffold” para os procedimentos endodônticos regenerativos, Torabinejad e Turman (2011) relataram sucesso após quase seis meses de tratamento com desenvolvimento de tecido mineralizado completo. Também é uma alternativa para os casos em que não se obtêm sangramento ao estimular o tecido apical. Relata-se que o PRP apresenta fatores de crescimento, produz agentes anti-inflamatórios, inicia a vascularização, induz diferenciação celular, controla a resposta inflamatória local e melhora o reparo por tecido mole e duro, entretanto traz como desvantagens a necessidade de coleta de sangue de pacientes jovens, aquisição de equipamentos especiais e aumento do custo do tratamento (Torabinejad; Turman, 2011).

Há também outros tipos de “scaffolds” biodegradáveis ou permanentes disponíveis como colágeno, ácido hialurônico ou sintéticos como o ácido poliglicólico ou hidroxiapatita (Gotlieb et al., 2008; Chandrhasa et al., 2011). Petrino et al. (2010) estimularam o sangramento para a formação do coágulo e sobre ele inseriram uma membrana colágena (CollaPlug, Zimmer Dental, Carlsbad, CA) e Jung et al. (2008) (Collatape, Sulzer Dental Inc, Plainsboro, NJ) em um dos seus casos relatou que a presença da membrana facilita a inserção posteriormente do MTA.

Por outro lado, há relatos de casos clínicos de tratamento sem o estímulo do sangramento para a formação do coágulo que relatam sucesso como término do desenvolvimento radicular (Chueh; Huang, 2006).

2.2.6 Selamento

O selamento é o último passo da terapia e deverá ser feito utilizando uma substância biocompatível capaz de selar adequadamente o terço cervical do canal radicular, mesmo na presença de umidade. O material mais utilizado tem sido o Agregado Trióxido Mineral (MTA) devido a sua ótima capacidade seladora, impedindo a recontaminação do canal radicular e biocompatibilidade. A maioria dos relatos demonstraram sucesso quando utilizaram o MTA como selamento (Banchs; Trope, 2004; Petrino, 2007; Thibodeau; Trope, 2007; Cotti et al., 2008; Jung et al., 2008; Ding et al., 2009; Reynolds et al., 2009; Shin et al., 2009; Thibodeau, 2009; Kim et al., 2010; Petrino et al., 2010; Thomson; Kahler, 2010; Cehreli et al., 2011; Torabinejad; Turman, 2011; Chen et al., 2012; Jeeruphan et al., 2012; Lenzi; Trope, 2012; Nosrat et al., 2012).

Nosrat et al. (2011) utilizaram uma mistura enriquecida de cálcio (CEM), uma substância que tem características de selamento e biocompatibilidade semelhantes ao MTA, é capaz de promover a formação de hidroxiapatita, induzir diferenciação de células-tronco e induzir a formação de tecido mineralizado (Asgary et al., 2009).

Iwaya et al. (2001) e Jung et al. (2008) utilizaram cimento de ionômero de vidro, e o primeiro complementou com resina composta, assim como todos os que

utilizaram o MTA. Chueh e Huang (2006) utilizaram como selamento materiais restauradores provisórios temporários seguidos de ionômero de vidro ou amálgama nos casos relatados. Jung et al. (2008) e Iwaya et al. (2011) em alguns dos seus relatos, após o desenvolvimento radicular completo, realizaram a obturação do dente com guta percha e selamento com resina composta.

2.3 CITOTOXICIDADE DAS MEDICAÇÕES SOBRE CÉLULAS DA PAPILA APICAL

Em 2011, um estudo mostrou que um número substancial de células tronco mesenquimais indiferenciadas estão presentes dentro do sistema de canais radiculares após os procedimentos endodônticos regenerativos (Lovelace et al., 2011). Esta descoberta foi muito importante, pois os protocolos de tratamento previamente usados na terapia endodôntica regenerativa tinham como objetivo a máxima desinfecção sem considerar o impacto delas sobre as células tronco (Diogenes et al., 2014). A interação entre células tronco, “scaffolds” e fatores de crescimento são conhecimentos da Endodontia regenerativa contemporânea e princípios da bioengenharia (Langer; Vacanti, 1993).

Por representar um dos pilares dos procedimentos endodônticos regenerativos, uma série de estudos avaliando o efeito da desinfecção do canal radicular sobre as células tronco tem sido conduzido. Estes estudos têm contribuído para que a Associação Americana de Endodontia recomende os protocolos de tratamento ideais para a Endodontia regenerativa (Law, 2013).

As pesquisas têm sido cruciais para fornecer evidências para modificações de protocolos de tratamento que visem aumentar os resultados favoráveis longe das armadilhas comuns dos protocolos usados atualmente (Diogenes et al., 2014).

Muitos estudos têm mostrado a eficácia bacteriana das pastas, mas poucos estudos descrevem a sua biocompatibilidade e o insucesso em alguns casos relatados pode ser devido à alta concentração utilizada clinicamente que pode ser tóxica aos tecidos (Gomes- Filho et al., 2012).

Ruparel et al. (2012) em estudo *in vitro* avaliaram algumas medicações intracanal utilizadas em procedimentos endodônticos regenerativos como a pasta tripla antibiótica (TAP) composta por ciprofloxacino, metronidazol e minociclina (1:1:1), a pasta dupla composta somente por ciprofloxacino e metronidazol (1:1) (DAP), a pasta tripla antibiótica modificada composta por ciprofloxacino, metronidazol e cefalosporina (1:1:1) (TAP modificado), a combinação de amoxicilina com ácido clavulânico (1:1) e o hidróxido de cálcio (Ultracal®XS, Ultradent, South Jordan, UT). Foi estabelecida cultura de células-tronco da papila apical a partir de terceiros molares com rizogênese incompleta. A medicação foi colocada sobre insertos com poros de 1 µm sobre os poços com as células aderidas de forma que as medicações não entrassem em contato direto com as células. Foram empregadas diluições de 100 mg/mL a 0,01 mg/mL. As placas foram incubadas por 3 dias, as células-tronco viáveis foram contadas por um método de coloração com azul de Trypan. Observaram que com todas as medicações, exceto o hidróxido de cálcio, houve um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração a partir de 1, 10 e 100 mg/mL. Nas concentrações mais baixas (0,01 e 0,1 mg/mL) não houve alteração na viabilidade. Com a pasta de hidróxido de cálcio não houve morte celular nas concentrações testadas e sim proliferação celular na concentração de 1 mg/mL. Neste estudo, não foi utilizada a concentração que corresponde ao emprego na rotina clínica (1000mg/mL), pois cristais da droga permaneceram não solubilizados comprometendo o ensaio. Concluíram por meio do estudo que o hidróxido de cálcio mostrou indução de proliferação sobre as células-tronco na concentração de 1 mg/mL. Com os outros medicamentos utilizados houve um decréscimo da viabilidade com o aumento da concentração, ressaltando que os medicamentos utilizados nesses procedimentos devem ser cuidadosamente selecionados e empregados em concentrações que demonstrem eficácia antibacteriana porém sem comprometimento à viabilidade celular.

Chuensombat et al. (2013) em estudo *in vitro* realizaram o cultivo celular de células da polpa e células da papila apical. As medicações utilizadas foram componentes da pasta tripla antibiótica empregados isoladamente ou em associação. A partir de uma concentração de 50 µg/mL em água destilada, foi feita uma diluição seriada para a obtenção das concentrações de 25; 6,25; 1,56; 0,39; 0,097 e 0,024 µg/mL com meio de cultura. O mesmo foi feito para as substâncias

isoladas. Os tempos experimentais foram de 1, 3, 5 e 7 dias e o teste utilizado foi o MTT. Os resultados mostraram que na menor concentração a viabilidade celular foi a mais alta e na maior a mais baixa em todos os períodos. No sétimo dia, a viabilidade diminuiu em 90% quando estimuladas por 25; 6,25 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Quando compararam as drogas em associação ou usadas isoladamente observaram que a associação dos antimicrobianos desempenhou maior citotoxicidade do que os antibióticos separadamente. A minociclina e o ciprofloxacino tiveram menos do que 90% de viabilidade celular nas três maiores concentrações e o metronidazol em todas as concentrações demonstrou efeito menor sobre a viabilidade celular. Já para a avaliação da eficácia antimicrobiana, amostras bacterianas foram coletadas de 20 dentes necrosados, aliquotadas e espalhadas sobre ágar em placas petri contendo 25 ou 0,39 $\mu\text{g/mL}$ da pasta com os antibióticos isoladamente ou em associação durante 7 dias. Os autores concluíram que 25 $\mu\text{g/mL}$ da pasta tripla antibiótica erradicaram todas as bactérias isoladas. Na concentração de 0,39 $\mu\text{g/mL}$ da pasta tripla ou na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ das drogas isoladas, o número de bactérias foi significativamente reduzido, mas sem eliminação completa.

Phumpatrakom e Srisuwan (2014) em estudo *in vitro* avaliaram células extraídas da polpa dental e da papila apical a partir de terceiros molares. Avaliaram a proliferação celular por meio do ensaio MTT dos dois tipos de células depois do tratamento com 1 mg/mL e 0,39 $\mu\text{g/mL}$ da pasta tri-antibiótica por 7 dias. Os autores compararam ainda a capacidade de diferenciação odontogênica e osteogênica na presença da medicação por meio de detecção de deposição de cálcio e pela detecção da expressão gênica de marcadores de mineralização. Ambas populações celulares não sobreviveram após o contato com a medicação a 1 mg/mL. Nos dois grupos de células houve diferença estatisticamente significativa com o grupo controle na concentração de 0,39 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma queda da viabilidade celular em contato com baixa concentração da medicação. A presença da medicação na concentração de 0,39 $\mu\text{g/mL}$ não interferiu na capacidade de diferenciação celular de ambas populações.

Althumairy et al. (2014) em estudo *in vitro* produziram discos de dentina humana a partir de terceiros molares extraídos sendo estes submetidos a contato com soluções irrigadoras e com as medicações: pasta tripla antibiótica contendo ciprofloxacino, metronidazol e minociclina (1:1:1), pasta com dois antibióticos:

ciprofloxacino, metronidazol (1:1) nas concentrações de 1 mg/mL e 1000 mg/mL e pasta à base de hidróxido de cálcio na forma comercial Ultracal®XS (Ultradent, South Jordan, UT). Foram utilizadas células da papila apical (SCAPs) juntamente com os discos de dentina inseridos em poços de placas de 24 poços juntamente com fatores de crescimento adicionados às células funcionando como um “scaffold”. Para o grupo controle, os discos submetidos ao contato com os medicamentos não foram adicionados à matriz com as células. O tempo experimental utilizado foi de 7 dias. Para determinação da viabilidade celular, o método escolhido foi *CellTiter-Glo® luminescence assay* (Promega, Madison, WI). Concluíram que as pastas antibióticas na concentração de 1000 mg/mL por 7 dias resultaram na morte das células cultivadas em dentina condicionada, enquanto na concentração de 1 mg/mL, ambas medicações mostraram nenhum efeito na sobrevivência das células da papila apical quando comparados com o grupo controle. O hidróxido de cálcio resultou em aumento significativo da sobrevivência e proliferação das células quando comparadas com o controle e com as pastas antibióticas. No tempo experimental de 28 dias, os resultados foram semelhantes aos obtidos com 7 dias com a concentração de 1 mg/mL para ambas medicações e com 1000mg/ mL o hidróxido de cálcio resultou aumento da sobrevivência e proliferação celular.

2.4 CONDIÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA

Todos os trabalhos relacionados à citotoxicidade de medicações intracanal sobre células da papila apical ocorrem em um ambiente em que as células cultivadas estão em condição fisiológica, ou seja, sem qualquer ativação prévia ao contato com a medicação testada. Como sabemos, os procedimentos endodônticos regenerativos são indicados para pacientes com dentes com polpa necrosada e com rizogênese incompleta, condição que é resultante de um processo inflamatório e colonizado por microrganismos. A importância de microrganismos na etiopatogenia da doença periapical já vem sendo amplamente elucidada pela literatura (Takehashi et al., 1965; Moller et al., 2004; Siqueira Jr; Roças, 2008). Mais de 40 espécies bacterianas já foram isoladas de canais radiculares de dentes com necrose pulpar (Zoletti et al., 2006; Roças; Siqueira Jr, 2008; Ricucci; Siqueira Jr, 2010).

O ácido lopoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis*, uma molécula anfifílica ancorada à parede celular bacteriana e está associado a processos inflamatórios, é um fator de baixa virulência presente na parede celular de bactérias Gram positivas (Hahn et al., 1991).

Geralmente presente em infecções persistentes, a prevalência de *Enterococcus faecalis* está relacionada às lesões periapicais que não regridem após a antisepsia realizada durante o tratamento endodôntico (Kaufman et al., 2005; Sedgley et al., 2006; Williams et al., 2006; Zoletti et al., 2006; Roças; Siqueira Jr, 2008). É encontrado na cavidade oral em locais como o dorso da língua, sulco gengival, canais radiculares e também na saliva (Sedgley et al., 2004, 2006).

Em ambientes desfavoráveis, *E. faecalis* pode assumir um estado denominado VBNC (viable but nonculturable- viável mas não cultivável), estratégia de sobrevivência que o mantém metabolicamente ativo até que condições favoráveis possam ser restabelecidas (Signoretto et al., 2000). *E. faecalis* é uma bactéria Gram positiva e seu LTA é considerado um fator de virulência importante (Signoretto et al., 2000; Bruserud et al., 2004; Kayaoglu; Orstavik, 2004; Sipert, 2007; Baik et al., 2008). Foi escolhido neste estudo, devido à sua importância nos processos patológicos em Endodontia.

Diante de uma invasão microbiana, a imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro. Trata-se de um conjunto de mecanismos de defesa celulares e bioquímicos existentes antes que um processo infeccioso se instale. São componentes do sistema imunológico natural as barreiras físicas e químicas como o epitélio e substâncias antibacterianas, células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos, células *natural Killer* (NK), proteínas do sangue e citocinas. Quando os microrganismos escapam à imunidade natural, invadindo e replicando-se nas células do hospedeiro, são necessários mecanismos mais poderosos e especializados para a defesa contra esses patógenos. A imunidade adquirida apresenta alto teor de especificidade para distinguir moléculas, característica de memória desenvolvendo novas respostas a um mesmo microrganismo com mais rapidez. Os principais componentes da imunidade adquirida são os linfócitos e seus produtos, os anticorpos (Abbas et al., 2012a).

O sistema imune, na presença do patógeno, aumenta a produção de fatores inflamatórios (Tsai et al., 2005) e os fibroblastos são capazes de reconhecer subprodutos bacterianos e responder com a produção de mediadores da inflamação (Yamaji et al., 1995).

O óxido nítrico tem recebido muita atenção desde a descoberta de suas funções no final dos anos 80. Apesar da alta reatividade e meia vida curta variando entre 3 e 60 segundos, rapidamente é destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (Kiechele; Malinski, 1993). É um gás solúvel e foi identificado primeiramente pela sua ação no relaxamento muscular, causando vasodilatação. A síntese de NO se realiza por ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS) a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que produz NO e L-citrulina, sendo necessária a presença de dois co-fatores, o oxigênio e o fosfato denucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) (Fouad, 2002). O NO é uma molécula mensageira intracelular (Bredt et al., 1990) com importantes funções cardiovascular, neurológica e imune (Nathan, 1992).

De acordo com o local, a quantidade produzida e os alvos no ambiente, o NO pode produzir diferentes efeitos. Pequena quantidade de NO produzida pelo endotélio vascular regula o relaxamento muscular e protege contra a adesão de leucócitos e plaquetas nas paredes do vaso sanguíneo. Essa propriedade pode ser considerada protetora e anti-inflamatória. Grande quantidade de NO liberada pelas células em resposta a citocinas pode destruir o tecido hospedeiro e diminuir discretamente a resposta celular (Fouad, 2002). O NO possui um papel nas respostas imunes não específicas, atuando com um agente tóxico em infecções (Carmignani et al., 2000). É possível confirmar que um dos primeiros atuantes em potencial da resposta inflamatória é o NO (Clancy; Abramson, 1995).

A presença desses mediadores inflamatórios e citocinas produzidas em condição pró inflamatória levam a crer que haverá uma alteração entre o padrão de resposta celular diante das medicações que podem diferir do ambiente fisiológico, alterando dessa forma os níveis de citotoxicidade.

Portanto, este trabalho é de grande relevância para que se conheça as diferenças de comportamento das células da papila apical sob estímulo das

medicações em condição fisiológica e pró-inflamatória e ainda observar a influência destas sobre as células e sua interação na duas condições quanto a produção de NO.

3 PROPOSIÇÃO

É de fundamental importância o conhecimento da citotoxicidade das medicações intracanal sobre células da papila apical, diante disso os objetivos do estudo foram traçados.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a citotoxicidade de medicações intracanal utilizadas em procedimentos endodônticos regenerativos sobre células de papila apical humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a influência do subproduto bacteriano, ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis*, na viabilidade de células da papila apical submetidas às medicações intracanal pasta tripla antibiótica modificada, CFC e CFC modificado.
- ✓ Avaliar a produção de óxido nítrico por células da papila apical humana quando estimuladas pelas medicações supracitadas condicionadas ou não por LTA de *Enterococcus faecalis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia foi realizada e subdividida nas etapas abaixo.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP, parecer 569.110 CAAE 26843914.0.0000.0075 (Anexo A).

4.2 COLETA DO TECIDO E ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA

Foi utilizado 1 dente recentemente extraído (terceiro molar hígido com rizogênese incompleta) de um paciente adulto livre de doenças sistêmicas da Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A doação do dente foi feita por meio de formulário específico previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B). O espécime foi transportado *em Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) até o Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística para seu processamento. Sob condições assépticas, o dente teve primeiramente todo o tecido gengival e periodontal removido. Com o auxílio de uma pinça, a papila apical foi destacada do tecido pulpar seguindo o protocolo de Sonoyama et al. (2006).

Os tecidos coletados foram fragmentados até que se conseguisse espécimes de 1 mm de espessura aproximadamente. Após a fragmentação, foi feita uma centrifugação de 200 x g/5min/temperatura ambiente (TA), os sobrenadantes foram descartados e os fragmentos foram ressuspensos em meio de cultura fresco: DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (todos os reagentes

provenientes de Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e transferidos para frascos de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. As culturas foram mantidas neste primeiro frasco até que as células alcançassem subconfluência, ou seja, quando 70% da área cultivável do frasco estava coberto por células, com trocas de meio a cada 2-3 dias. A expansão foi realizada da seguinte forma: a camada celular foi lavada com PBS (1X, Tampão Salina-Fosfato pH= 7,2; LGC Biotecnologia) e para a remoção das células aderidas ao fundo do frasco foi utilizada solução de tripsina (1mL) a 0,25% contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1mM (Invitrogen/Gibco), por 3 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada utilizando-se meio de cultura contendo SBF e as células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio de 15 mL e centrifugadas a 200 x g/5min/TA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspensão em 1 mL de meio de cultura fresco. Alíquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em frascos de 25 cm² contendo 3 mL de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares. A utilização das células ocorreu a partir da quarta passagem. Foram seguidos os protocolos para a cultura de fibroblastos conforme literatura (Sipert, 2007; Morandini et al., 2010; Sipert et al., 2010; Morandini et al., 2011). Os experimentos de cultura de células foram realizados no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOUSP em colaboração com a Prof^a Dr^a Márcia Martins Marques e Prof^a Dr^a Carla Renata Sipert.

4.3 PREPARO DOS MEDICAMENTOS

As substâncias testadas foram: (A) TAP mod, componentes da pasta tripla antibiótica modificada contendo metronidazol, ciprofloxacino e cefalosporina (1:1:1); (B) CFC, composto por metronidazol, ciprofloxacino e hidróxido de cálcio (1:1:2); e (C) uma modificação do CFC composto por metronidazol, ciprofloxacino e hidróxido de cálcio (2:2:1). Os medicamentos foram manipulados na forma de pó pela Farmácia Fórmula & Ação- SP.

4.4 CONDICIONAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO E DILUIÇÃO SERIADA

As medicações foram reconstituídas em DMEM 10% SBF na concentração de 1mg/mL e incubados a 37°C por 24 horas. As soluções foram esterilizadas com filtros de 0,22µm e submetidas a diluição seriada de $\frac{1}{4}$ resultando, portanto, em concentrações de 250; 62,5; 15,62; 3,9 e 0,97 µg/mL (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Diluição seriada das medicações intracanal testadas

4.5 PLAQUEAMENTO E ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS DE PAPILA APICAL COM AS MEDICAÇÕES INTRACANAL

Previamente ao plaqueamento, parte das células foram ativadas com LTA de *Enterococcus faecalis* (Sigma-Aldrich, L4015) na concentração de 1 µg/mL durante 7 dias com trocas do meio de cultura com LTA a cada dois dias.

Células ativadas ou não foram distribuídas em placas de 24 e 96 poços para a coleta do sobrenadante para avaliação da dosagem de óxido nítrico e para análise da viabilidade celular por meio ensaio de MTT numa quantidade de 5×10^4 e $1,25 \times 10^4$ células por poço, respectivamente e complementadas com meio de cultura. Após 24 horas, foi adicionado meio somente ou contendo medicação nos volumes de 100µL para placas de 96 poços e 500 µL para placas de 24 poços pelos períodos experimentais de 1, 3, 5 e 7 dias.

4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do estudo foram estabelecidos 8 grupos experimentais distribuídos conforme quadro 4.1.

Grupo Experimental	Condição da Célula	Medicações Intracanal	Tipo de meio de cultura
Controle DMEM	Fisiológica		DMEM 10% SBF
Controle LTA	Ativada		DMEM 10% SBF
MOD	Fisiológica	CFC modificado	DMEM 10% SBF + MOD
MOD LTA	Ativada	CFC modificado	DMEM 10% SBF + MOD
CFC	Fisiológica	CFC	DMEM 10% SBF + CFC
CFC LTA	Ativada	CFC	DMEM 10% SBF + CFC
TAP mod	Fisiológica	TAP mod	DMEM 10% SBF + TAP mod
TAP mod	Ativada	TAP mod	DMEM + 10% SBF + TAP mod

Quadro 4.1 – Distribuição dos grupos experimentais

4.7 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE POR MTT

A citotoxicidade das medicações sobre células da papila apical ativadas ou não por LTA foi avaliada por meio de ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. Após cada período experimental, o meio de cultura foi substituído por solução de MTT a 5 mg/mL em PBS. Após os tempos experimentais descritos, os poços foram aspirados e 10µL de solução de MTT foram adicionados aos poços (placas de 96 poços) seguidos de 90µL de DMEM 10% a cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4 h protegidas da luz. O MTT foi então descartado e 100 µL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) adicionado a tampão glicina na proporção(4:1) foi colocado em cada poço. A placa foi incubada em mesa agitadora durante 30 min para dissolver os cristais de

formazan que coraram as mitocôndrias. O valor da densidade óptica foi medido por espectrofotômetro Synergy HT Biotek® (Biotek®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 562nm. O metabolismo celular é considerado diretamente proporcional à quantidade de formazan formado.

4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

Para determinação da liberação de óxido nítrico no sobrenadante das células, a produção de nitrito (NO_2^-) foi mensurada pelo Método de Griess (Nathan, 1992). Os sobrenadantes foram colhidos e inseridos em tubos de microcentrífuga previamente nomeados. Alíquotas de 50 μL de sobrenadante celular em triplicata foram distribuídas em placas de 96 poços. As medicações diluídas em DMEM foram utilizadas como branco para os sobrenadantes correspondentes. Posteriormente foi adicionado 25 μL de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico 5% com incubação da TA por 10 min protegidos da luz. Em seguida, 25 μL de naftiletilenodiamino Dihidroclorídrico (NED) a 0,1% em água destilada foi adicionado aos poços. Após nova incubação a TA por 10 min protegidos da luz, a absorbância foi medida em comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro de placas Synergy HT Biotek® (Biotek®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA). Como parâmetro para a quantificação foi utilizada curva padrão preparada a partir de diluição seriada de $\frac{1}{2}$ de NaNO_2 a 200 μM .

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por meio da análise de variância a 1 critério (ANOVA) seguida do pós teste de Tukey para o ensaios do MTT e método de Griess, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados abaixo foram subdivididos quanto a citotoxicidade das medicações sobre células da papila apical pelo ensaio do MTT e pela produção de óxido nítrico pelo método de Griess.

5.1 CITOTOXICIDADE DAS MEDICAÇÕES SOBRE CÉLULAS DA PAPILA APICAL

A viabilidade celular foi analisada nos tempos experimentais de 1, 3, 5 e 7 dias (Figura 5.1: A – D).

A figura 5.1 A ilustra a viabilidade celular frente ao contato com a pasta tripla antibiótica modificada durante um dia. A viabilidade celular foi significativamente alterada no grupo em condição fisiológica a partir de 62 µg/mL enquanto que este fenômeno é observado a partir de 250 µg/mL em células ativadas. Importante ressaltar que a redução de viabilidade celular no grupo em condição fisiológica chegou a 50% quando em contato com a medicação nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL (Figura 5.1 A).

A figura 5.1 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica modificada por 3 dias. Na condição fisiológica (DMEM), a viabilidade celular é significativamente afetada a partir de 15,62 µg/mL em comparação com o respectivo controle resultando em valores de $p < 0,01$ para 15,62 µg/mL e $p < 0,001$ para as concentrações de 62,5; 250 e 1000 µg/mL. Nas células ativadas, percebe-se que a viabilidade celular foi significativamente afetada nas concentrações de 62,5 µg/mL ($p < 0,01$), 250 e 1000 µg/mL ($p < 0,001$) em relação ao controle.

A figura 5.1 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica por 5 dias. Em ambas situações, observa-se comprometimento significativo da viabilidade celular nas três maiores concentrações da medicação em comparação com os respectivos controles. Todavia, neste período experimental observa-se significativo aumento dos valores de densidade óptica para

todas as condições experimentais do grupo de células ativadas em comparação com seus respectivos pares em células em condição fisiológica.

A figura 5.1 D ilustra os resultados obtidos a partir da análise do período experimental de 7 dias. No grupo de células em condição fisiológica, a concentração de 1000 µg/mL aparece como a única a comprometer a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle. No entanto, em células ativadas, a partir de 62 µg/mL a pasta triantibiótica resultou em redução da viabilidade celular significativa em relação ao seu controle. Como observado no grupo experimental de 5 dias, a ativação celular resultou em valores significativamente maiores de atividade mitocondrial em todas as concentrações de medicação em comparação com seus respectivos pares em células não ativadas previamente.

Figura 5.1 – Viabilidade de células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) à TAP modificada nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

A figura 5.2 (A-D) ilustra os resultados do ensaio MTT para células em contato com CFC modificado.

A figura 5.2 A se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 1 dia. Em condição fisiológica, a de 15,62 µg/mL resultou em aumento significativo dos dados de atividade mitocondrial em relação ao controle. Em células ativadas, aumento similar é observado na concentração de 250 µg/mL se comparada ao grupo controle e às demais concentrações.

A figura 5.2 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 3 dias. Em condição fisiológica, novamente observa-se aumento da atividade mitocondrial na concentração de 15,62 µg/mL sendo quase 50% maior que o respectivo controle ($p < 0,001$). No grupo de células ativada, observa-se diferentemente que a viabilidade celular foi significativamente diminuída quando das células em contato com a medicação a 1000 µg/mL em comparação ao respectivo controle ($p < 0,05$). Neste período experimental observa-se atividade mitocondrial superior em células ativadas em comparação com seus pares em condição fisiológica para o grupo sem medicação, para as três menores concentrações de medicação e ainda para 1000 µg/mL.

A figura 5.2 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 5 dias. Mais uma vez, observa-se aumento da atividade mitocondrial na concentração de 15,62 µg /mL em células em condição fisiológica em comparação com seu respectivo controle. Todavia, não se observa alteração entre as condições a que foram submetidas células ativadas. A medicação na concentração de 250 µg/mL foi a única condição que resultou em valores maiores em células ativadas do que em comparação com a resposta obtida pelas substâncias em células em condição fisiológica.

A figura 5.2 D se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 7 dias. A medicação não foi capaz de alterar significativamente a atividade mitocondrial das células em condição fisiológica. Entretanto, observa-se alteração significativa destes resultados em células ativadas. Aumento desta atividade pode ser observado com 15,62 µg/mL e redução com 1000 µg/mL. Todas as condições experimentais a que foram submetidas células ativadas resultaram em

valores de densidade óptica significativamente superiores aos seus pares em células em condição fisiológica.

Figura 5.2 – Viabilidade de células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) ao CFC modificado nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

A figura 5.3 (A-D) ilustra os resultados do ensaio MTT para células em contato com CFC.

A figura 5.3 (A-D) ilustra os resultados obtidos pelo contato das células com a medicação CFC. A figura 5.3 A se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 1 dia. Observa-se aumento dos valores de densidade óptica para a concentração de 0,97 µg/mL em células em condição fisiológica e na concentração de 3,9 µg/mL em células ativadas, ambos os casos em comparação com seus respectivos controles.

A figura 5.3 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 3 dias. Neste período experimental não se observa alteração da atividade mitocondrial de células em condição fisiológica em contato com a medicação. No entanto, para as células ativadas, observa-se aumento significativo desta atividade na concentração de 0,97 µg/mL ($p < 0,01$) e diminuição significativa na concentração de 1000 µg/mL ($p < 0,001$). Nas concentrações de 0,97; 15,62 e 62,5 µg/mL, observa-se maior atividade celular nos grupos ativados em relação aos seus pares em condição fisiológica.

A figura 5.3 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 5 dias. Em condição fisiológica, as células sofreram perda de atividade quando em contato com as três concentrações maiores de medicação em relação ao controle, fenômeno este não observado em células ativadas. Estas, por sua vez, resultaram em maiores níveis de atividade mitocondrial quando em contato com a medicação em suas cinco maiores concentrações em comparação com os respectivos pares em situação fisiológica.

A figura 5.3 D se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 7 dias. No grupo de células não ativadas previamente, observa-se alteração significativa da viabilidade na concentração de 1000 µg/mL ($p < 0,01$). No grupo de células ativadas, observa-se padrão semelhante com queda significativa dos valores de atividade para 1000 µg/mL, porém observa-se aumento deste parâmetro para a concentração de 15,62 µg/mL em comparação com o respectivo controle ativado. Mais uma vez observa-se valores significativamente superiores para as células ativadas em comparação com os respectivos pares em condição fisiológica para todas as condições neste período experimental.

Figura 5.3 – Viabilidade de células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) ao CFC nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

Pelo fato da concentração de 1000 µg/mL tratar-se daquela mais próxima da condição empregada clinicamente, ela foi escolhida para o estabelecimento de uma comparação entre todos os tempos experimentais: 1,3, 5 e 7 dias (Figura 5.4 A-C).

A figura 5.4 A representa o resultado obtido pelas células em contato com a pasta tripla antibiótica na concentração de 1 mg/mL. Nesta medicação observa-se padrão compatível com citotoxicidade em todos os tempos experimentais para ambas condições celulares (fisiológica e ativada).

O CFC modificado (Figura 5.4 B) apresentou padrão compatível com redução de viabilidade apenas no período experimental de 7 dias em células ativadas.

O CFC (Figura 5.4 C) apresentou alteração da viabilidade celular nos períodos experimentais de 3, 5 e 7 dias para ambas condições celulares (fisiológica e ativada).

A

B

C

Figura 5.4 – Viabilidade de células da papila apical após exposição de 1, 3, 5 e 7 dias à 1mg/mL ou meio somente (0) à TAP modificada (A), ao CFC modificado (B) e ao CFC (C), em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

5.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS DE PAPILA APICAL EM CONTATO COM AS MEDICAÇÕES INTRACANAL

A produção de NO foi analisada nos tempos experimentais de 1, 3, 5 e 7 dias (Figura 5.5 A-D) por meio da detecção de traços de nitrito no sobrenadante celular.

A figura 5.5 A se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica durante 1 dia. Observa-se que a medicação induziu quantidades significativas de NO em comparação com os respectivos controles, com exceção da concentração de 3,9 µg/mL.

A figura 5.5 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica durante 3 dias. De maneira semelhante, percebe-se que o contato com a medicação induziu quantidades significativas de NO em comparação aos respectivos controles, com exceção da concentração de 3,9 µg/mL em células em condição fisiológica. Adicionalmente, observa-se níveis significativamente inferiores de NO na concentração de 0,97 µg/mL e maiores na concentração de 15,62 µg/mL produzidos por células ativadas em comparação com seus pares em condição fisiológica.

A figura 5.5 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica modificada durante 5 dias. Novamente observa-se indução importante de NO pela medicação intracanal com exceção da concentração de 250 µg/mL em ambas condições de atividade celular. Os níveis de NO induzidos pela pasta a 0,97 µg/mL foram menores em células ativadas enquanto que aqueles induzidos pelas substâncias a 3,9 e 15,62 µg/mL foram significativamente superiores aos níveis produzidos por células em condição fisiológica.

A figura 5.5 D se refere aos grupos que receberam condicionamento com a pasta tripla antibiótica modificada durante 7 dias. Neste período experimental, observa-se produção importante de NO nos grupos controle tanto para células em condição fisiológica como para células ativadas. Nas primeiras, observa-se que a medicação induziu aumento importante de NO na concentração de 0,97 µg/mL, porém houve diminuição significativa deste mediador para todas as demais concentrações. No grupo de células ativadas, a produção de NO foi maior para 3,9 e

15,62 µg/mL e menor para o controle, 0,97 e 62,5 µg/mL do que aquela detectada no grupo em condição fisiológica.

Figura 5.5 – Produção de NO por células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) ao TAP modificado nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

A figura 5.6 (A-D) ilustra a produção de NO induzida pela medicação CFC modificado.

Na figura 5.6 A, observam-se os grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 1 dia. No grupo de células em condição fisiológica, a única concentração que induziu quantidades significativas de NO foi 62,5 µg/mL ($p < 0,001$). Para as células ativadas, observa-se aumento significativo deste mediador nas concentrações de 3,9; ($p < 0,05$) 15,62 ($p < 0,001$); 62,5 ($p < 0,001$) e 1000 µg/mL ($p < 0,05$). Comparativamente, células ativadas produziram níveis significativamente maiores de NO apenas com a medicação a 1000 µg/mL em comparação com células em condição fisiológica.

A figura 5.6 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 3 dias. A produção de NO foi significativamente induzida por células em condição fisiológica nas concentrações de 0,97 µg/mL ($p < 0,001$), 62,5 µg/mL ($p < 0,001$) e 250 µg/mL ($p < 0,05$). Em células ativadas, os níveis de NO das concentrações: 3,9; 15,62 e 62,5 µg/mL foram superiores que os níveis do respectivo controle ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,001$). Na comparação entre as condições celulares, células ativadas em contato com a medicação na concentração de 0,97 µg/mL produziram menor quantidade de NO que a mesma concentração do grupo em condição fisiológica.

A figura 5.6 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 5 dias. Indução significativa de NO pode ser observada para células em condição fisiológica em contato com a medicação nas concentrações de 0,97; 62,5 e 250 µg/mL ($p < 0,001$). Para células ativadas, foram significativos os níveis induzidos pelas concentrações 3,9; 15,62; 62,5; 250 e 1000 µg/mL em relação ao respectivo controle ($p < 0,001$). Na comparação entre os grupos observam-se valores significativamente mais altos nas concentrações de 15,62 µg/mL ($p < 0,01$) e 1000 µg/mL ($p < 0,001$) para o grupo de células ativadas. Por outro lado, para a concentração de 250 µg/mL houve maior produção no grupo fisiológico do que no ativado ($p < 0,05$).

A figura 5.6 D se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC modificado por 7 dias. Novamente, observa-se produção importante de NO em ambos grupos controle sendo a medicação capaz de reduzir estes valores para as

células em condição fisiológica de forma significativa para a concentração de 1000 ug/mL. O fenômeno contrário é observado no grupo ativado no qual observa-se aumento de quase duas vezes em comparação com seu respectivo controle ($p < 0,001$). Na comparação entre os grupos, essa diferença foi de 4 vezes mais em relação à produção da célula em condição fisiológica ($p < 0,001$).

Figura 5.6 – Produção de NO por células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) ao CFC modificado nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

A figura 5.7 (A-D) ilustra a produção de NO induzida por CFC.

Na figura 5.7 A, observa-se esta produção no tempo experimental de 1 dia. Em condição fisiológica, células produziram NO em níveis significativos quando em contato com a medicação nas concentrações de 0,97 ($p<0,01$), 62,5 ($p<0,001$); 250 ($p<0,001$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$) quando comparados ao controle. Em células ativadas, observa-se este aumento para 0,97 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$); 15,62 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,01$); 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$); 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$). Na comparação entre os grupos, apenas a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de induzir níveis maiores de NO em comparação com células em condição fisiológica.

A figura 5.7 B se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 3 dias. Novamente, observa-se a indução de NO pela medicação nas concentrações de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,01$), 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$) e 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$). Células ativadas, por sua vez, apresentaram aumento da produção de NO em todas as concentrações de medicação, exceto 0,97 $\mu\text{g/mL}$ obedecendo a um padrão concentração-dependente. Na comparação entre os grupos, observa-se padrão antagônico uma vez que a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ resultou em produção maior para células não ativadas ($p<0,05$) enquanto que a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ resultou em níveis significativamente aumentados para as células ativadas ($p<0,001$).

A figura 5.7 C se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 5 dias. A produção de NO pode ser observada pela medicação nas concentrações de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$), 62,5 e 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$) em células em situação fisiológica. Em células ativadas, observa-se aumento significativo para as concentrações de 15, 62 ($p<0,05$), 250 ($p<0,001$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$). No grupo LTA, 15,62 $\mu\text{g/mL}$ produziu quantidade inferior a 10 μM , 250 $\mu\text{g/mL}$ superior a 10 μM e 1000 $\mu\text{g/mL}$ superior a 20 μM , quantidades bem superiores ao controle que foi quase zero ($p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,001$) respectivamente. Na comparação entre os grupos, 1000 $\mu\text{g/mL}$ do grupo LTA produziu quatro vezes a mais de NO que sua respectiva concentração do grupo fisiológico.

A figura 5.7 D se refere aos grupos que receberam condicionamento com o CFC por 7 dias. Em células não estimuladas, apenas a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de induzir produção significativa de NO ($p<0,01$) enquanto que em células

ativadas, este aumento pode ser visualizado nesta concentração ($p < 0,05$) e também em 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). Na comparação entre os grupos, 1000 $\mu\text{g/mL}$ do grupo LTA observa-se mais que o dobro de NO que a mesma concentração do grupo fisiológico.

Figura 5.7 – Produção de NO por células da papila apical após exposição por 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 7 dias (D) ao CFC nas concentrações indicadas ou com meio somente (0) em condição fisiológica (DMEM) e estimuladas previamente por LTA de *E. faecalis* (LTA). Resultados representativos de um doador com ensaio em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) em comparação com grupo não estimulado (0). Diferenças observadas entre as mesmas concentrações em diferentes condições (fisiológica ou pró inflamatória) representadas pelo símbolo (#), (##) e (###) para diferenças de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente

6 DISCUSSÃO

As mudanças no tratamento de pacientes com dentes imaturos com periodontite apical previamente submetidos à cárie ou trauma proporcionaram novas perspectivas como a continuação do desenvolvimento radicular que proporcionam uma maior resistência a estes dentes, com diminuição da incidência de fratura ou perda do elemento dental.

A desinfecção destes dentes é etapa fundamental do tratamento e para isso são utilizadas medicações intracanal para reduzir a carga microbiana para promoção de ambiente propício para o reparo tecidual. Abordagens clínicas recentes têm sugerido que células-tronco supostamente presentes na papila apical sofreriam indução de diferenciação em células como odontoblastos ou cementoblastos levando à formação de tecido mineralizado com consequente aumento de espessura e de comprimento radicular em dentes com rizogênese incompleta. Sendo assim a medicação intracanal empregada na desinfecção da cavidade pulpar não pode ser citotóxica às células remanescentes dos tecidos periapicais.

Os testes de biocompatibilidade e citotoxicidade são essenciais e recomendados para os materiais que são utilizados na área da saúde. A American Dental Association (ADA) recomenda uma sequência de testes de biocompatibilidade para os materiais dentários (Craig, 1997). A sequência consiste em testes iniciais, secundários e de uso. Nos testes iniciais são realizados ensaios *in vitro* para a citotoxicidade e para mutagênese para os materiais dentários e seus componentes.

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade do material realizar a função que foi proposto sem causar efeitos indesejáveis (Williams, 2003) como reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos. A biocompatibilidade compreende as interações dos tecidos e fluidos com um material. Quando o material é colocado em um tecido vivo gerará algum tipo de resposta biológica. A citotoxicidade pode resultar em um amplo espectro de efeitos, como alterações metabólicas e morte celular. Os testes de citotoxicidade são a primeira etapa para se assegurar a biocompatibilidade de um

material (Wataha, 2001). Algumas maneiras de avaliar a citotoxicidade pode ser por meio do ensaio de MTT, utilizado neste trabalho.

Outro fator de grande importância a ser considerado é a remoção das pastas, pois resíduos antimicrobianos presentes no interior das paredes dentinárias podem afetar a viabilidade celular após estimulação do sangramento e formação do coágulo (Berkhoff et al., 2014).

Ruparel et al. (2012) em trabalho *in vitro* com células-tronco da papila apical avaliaram a citotoxicidade de algumas medicações intracanal como a pasta tripla antibiótica, pasta dupla, pasta tripla antibiótica modificada, amoxicilina associada ao ácido clavulânico (Augmentin®) e de hidróxido de cálcio (Ultracal®XS, Ultradent, South Jordan, UT) por meio de contagem de viabilidade com corante azul de Trypan. Após 3 dias, foi observado decréscimo da viabilidade com o aumento da concentração do medicamento para todas as pastas antibióticas. A pasta de hidróxido de cálcio, na concentração de 1 mg/mL, induziu proliferação celular, segundo os autores. Conclui-se que a pasta tripla antibiótica pode desempenhar efeito citotóxico em um padrão concentração-dependente, diferentemente do observado para o hidróxido de cálcio. Já Chuensombat et al. (2013) em estudo *in vitro* com células da polpa e da papila apical utilizando ensaio de MTT, concluíram que nas concentrações de 25; 6,25 e 1,56 µg/mL da pasta tripla antibiótica ocorreu perda da viabilidade celular em torno de 90% no período experimental de sete dias. Conclui-se, portanto, que baixas concentrações desta medicação apresentam alta toxicidade celular *in vitro*. Phumpatrakom e Srisuwan (2014) em estudo *in vitro* com células da polpa dental e da papila apical por meio de ensaio de MTT avaliaram a citotoxicidade da pasta tripla antibiótica. Observou-se também padrão de resposta concentração-dependente sendo que no período experimental de sete dias, a viabilidade celular foi comprometida de forma importante quando células foram mantidas em contato com 1 mg/mL sendo que mesmo na concentração de 0,39 µg/mL, houve diminuição da viabilidade quando comparada ao grupo controle.

Porém Althumairy et al. (2014), em estudo *in vitro* utilizaram o ensaio *CellTiter-Glo® luminescence assay* (Promega, Madison, WI), um método que realiza cultura em três dimensões em que a contagem das células é realizada com adição de reagentes e a leitura por luminescência, utilizaram a mesma concentração no mesmo período experimental (7 dias) com discos de dentina expostos à pasta tripla

antibiótica em cultura de células da papila apical, não foi observada diminuição na viabilidade com 1mg/mL após 7 dias quando comparado ao grupo controle, porém com 1000mg/mL houve morte de todas as células cultivadas. Já com hidróxido de cálcio (Ultracal®XS, Ultradent, South Jordan, UT) ocorreu proliferação celular com 7 e 28 dias.

No presente estudo, diferentes formulações de medicação intracanal foram testadas em contato com células de papila apical humana em condição fisiológica (não ativadas) ou após ativação com LTA de *Enterococcus faecalis*. Neste trabalho, considerando o efeito da pasta tripla antibiótica modificada sobre células em ambiente fisiológico, no primeiro dia (Figura 5.1 A) já observou-se uma queda de mais de 50% da viabilidade celular nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL. No terceiro dia (Figura 5.1 B) observou-se diminuição da viabilidade já a partir da concentração de 15,62 µg/mL, sendo que no quinto e sétimo dias (Figura 5.1 C e D) a queda da viabilidade foi observada nas maiores concentrações de medicação. Portanto, observou-se que a citotoxicidade aumentou com o aumento da concentração, contrastando com dados encontrados por Ruparel et al. (2012) em que 100 µg/mL não apresentaram citotoxicidade. Nossos dados também diferem dos achados de Chuensombat et al. (2013) que observaram 90% de redução de viabilidade com 1,56 µg/mL por 7 dias, sendo que no presente trabalho, observou-se manutenção da atividade mitocondrial com até 3,9 µg/mL por até 7 dias. Phumpatrakom e Srisuwan (2014) também observaram diminuição da viabilidade com 1 mg/mL, porém morte celular total com 7 dias, diferentemente do que observou-se neste estudo em sete dias. Foi observada por estes autores citotoxicidade importante já com 0,39 µg/mL, o que não observou-se no presente estudo. Diferente de Althumairy et al. (2014) observou-se morte celular com a concentração de 1mg/mL em todos os períodos experimentais, porém este ensaio difere bastante do presente estudo.

Uma das razões que pode contribuir para a citotoxicidade da pasta tripla antibiótica é o baixo pH da solução (4.0- 4.6), principalmente pela presença da minociclina e do ciprofloxacino. A quebra dos íons de hidrogênio do grupo HCl resulta em condição ácida que é uma condição desfavorável para a viabilidade celular (Kobayashi et al., 2007).

As diferenças dos resultados obtidos pelo presente estudo em relação a relatos prévios da literatura podem ocorrer devido às diferenças nas metodologias empregadas: como as células utilizadas e os ensaios a que foram submetidas. Ruparel et al. (2012) utilizaram células-tronco da papila apical e insertos transwell para evitarem o contato direto das células com os medicamentos e o Ensaio foi Azul de Trypan, Chuensombat et al. (2013) células da polpa ou papila apical e para avaliação o MTT, Phumpatrakom e Srisuwan (2014) células da polpa dental e da papila apical e também o MTT e Althumairy et al. (2014) células tronco da papila apical, os medicamentos foram colocados diretamente sobre a dentina e o método *CellTiter-Glo® luminescence assay*, cuja contagem é avaliada por luminescência. A manipulação, preparo das medicações e as diferentes técnicas de viabilidade celular são fatores que também podem gerar resultados distintos. Entretanto, parece haver consenso entre os autores quanto à citotoxicidade promovida por altas concentrações de medicações formuladas a base de antimicrobianos, ressaltando a importância da utilização em concentrações pequenas e efetivas, além da atenção especial na sua remoção.

O presente estudo avaliou também medicações utilizadas nos tratamentos endodônticos convencionais com indicação para infecções persistentes. O CFC modificado: ciprofloxacina, metronidazol e hidróxido de cálcio (2:2:1) e o CFC composto pelas mesmas substâncias na proporção 1:1:2. Estas formulações empregam dois componentes da pasta tripla antibiótica (TAP) adicionados de hidróxido de cálcio, componente este que atualmente obtém resultados favoráveis com relação à biocompatibilidade, por induzir proliferação celular em concentrações nas quais outras substâncias apresentam citotoxicidade importante (Ruparel et al., 2012; Althumairy et al., 2014). Quimicamente, o hidróxido de cálcio é uma base forte com pH de aproximadamente 12,5 a 12,8; cuja ação principal é a dissociação iônica dos íons (Ca^{2+}) e hidroxila (OH^-), levando à alcalinidade do meio conferindo à substância atividade antibacteriana importante, além de inativação de endotoxinas (Mohammadi; Dummer, 2011, Safavi e Nichols, 1993). O hidróxido de cálcio em contato com o tecido exposto induz a formação de uma zona de necrose superficial, que é saturada pelos íons cálcio, e assim parece estimular a formação de uma barreira de tecido mineralizado (Farhad; Mohammadi, 2005; Mohammadi; Dummer, 2011).

Acredita-se que a associação destas substâncias resultaria em efeitos antimicrobianos mais efetivos, além de um equilíbrio do pH. Como mencionado anteriormente, os antimicrobianos apresentam pH baixo e o hidróxido de cálcio, pH alto; sendo que ambas situações levam à necrose celular (Holland et al., 1999; Mohammadi; Dummer, 2011), o que é muito controverso entre os autores, uma vez que alguns autores o consideram biocompatível (Ji et al., 2010; Gomes-Filho et al., 2012; Ruparel et al., 2012; Althumairy et al., 2014).

No grupo em que simulamos um ambiente em homeostasia, o CFC modificado (2:2;1) apresentou baixos níveis de citotoxicidade em todos os tempos experimentais. A viabilidade celular se manteve inalterada em todas as concentrações, exceto na concentração de 15,62 µg/mL no primeiro, terceiro e quinto dias em que houve proliferação celular (151%, 148,4%, 132.9%) respectivamente (Figura 5.2 A, B e C). Estudos futuros precisariam demonstrar se esta seria uma concentração suficiente para exercer a ação antimicrobiana adequada. Com base no nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo a avaliar a citotoxicidade deste medicamento, conclui-se que, nas condições experimentais deste estudo, o CFC modificado não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração quando em contato com células da papila apical, podendo ser considerado uma substância promissora para procedimentos endodônticos regenerativos, uma vez que seus componentes são conhecidos na rotina endodôntica.

O grupo de células em condição fisiológica submetido ao CFC (1:1:2) apresentou manutenção da viabilidade celular em todas as concentrações após 1 e 3 dias de contato (Figura 5.3 A e B DMEM), porém no quinto dia (Figura 5.3 C DMEM) houve uma queda da viabilidade nas concentrações de 62,5; 250 e 1000 µg/mL de 36%, 37% e 45% respectivamente. Já no sétimo dia (Figura 5.3 D DMEM) somente a concentração de 1000 µg/mL apresentou diminuição de viabilidade celular, em torno de 30%.

A citotoxicidade observada para esta medicação pode ser considerada inferior à observada para a pasta composta somente por antimicrobianos. Entretanto, os padrões de citotoxicidade foram superiores aos observados para o CFC modificado. A maior quantidade de hidróxido de cálcio na composição pode ter provocado aumento no pH da substância, ou ainda a interação entre os componentes nestas

proporções pode ter resultado em efeito nocivo às células em comparação com o CFC modificado.

Os estudos prévios da literatura que empregaram metodologias *in vitro* para a análise da citotoxicidade de medicações avaliam o efeito das substâncias sobre células em condição fisiológica, ou seja, que não foram submetidas previamente a ativação por estímulos pró-inflamatórios (Ruparel et al., 2012; Chuensombat et al., 2013; Althumairy et al., 2014; Phumpatrakom; Srisuwan, 2014). Entretanto, em quadros de periodontite apical em dentes com rizogênese incompleta, as células da papila potencialmente existentes se encontrariam em condição pró-inflamatória resultante da presença de microrganismos na cavidade pulpar e de mediadores inflamatórios liberados por células da polpa, da própria papila ou dos tecidos periapicais. Sendo assim, este estudo também avaliou o efeito de medicações intracanal em tal condição. Para indução do ambiente pró- inflamatório utilizou-se ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis*, fator de virulência presente na parede celular de bactérias Gram positivas (Hahn et al., 1991). O LTA é uma molécula anfifílica ancorada à parede celular bacteriana e está associado a processos inflamatórios. Entretanto, seu potencial imunoestimulatório é inferior ao do lipopolissacarídeo (LPS), constituinte de bactérias Gram negativas. Sendo assim, constituímos um ambiente de baixa virulência sobre células da papila apical por meio da adição deste subproduto bacteriano na cultura previamente aos ensaios propriamente ditos, uma vez que este subproduto foi capaz de alterar a produção constitutiva de quimiocinas *in vitro* em células de ligamento periodontal e polpa dental (Sipert et al., 2014).

A escolha de um componente da parede celular de microrganismos Gram-positivos como estímulo nos pareceu importante, uma vez que as infecções da cavidade oral são polimicrobianas e estes microrganismos podem ser encontrados em grande frequência e quantidade. *Enterococcus faecalis* é comumente encontrado em lesões periapicais persistentes e seu papel na indução da doença periapical ainda não é claramente elucidado, por isso a importância da escolha pelo LTA (Sedgley et al., 2006; Roças; Siqueira Jr, 2008). Especula-se que a resposta celular a LTA seja desencadeada a partir da interação desta molécula com receptores de imunidade inata (*Toll-like receptor TLR2/ TLR6* (Jin et al., 2007), comumente presentes em células residentes de tecidos conjuntivos (Morandini et al., 2013).

Ao submeter as células em contato com as medicações após ativação com LTA, observa-se de maneira geral, o aumento da atividade mitocondrial especialmente nos períodos experimentais mais longos. Esta diferença chega a ser estatisticamente significativa em cinco dias (CFC e TAP mod) e em sete dias para as três medicações testadas. A ativação celular resultou em perda de viabilidade em comparação com o respectivo controle para CFC modificado (3 e 7 dias, figura 5.2 B, D LTA); CFC (3 dias) e para a pasta tripla antibiótica modificada (7 dias) em concentrações de medicação que não haviam resultado em tais diferenças em células em condição de homeostasia. Por outro lado, diminuições na viabilidade observadas em condição fisiológicas foram completamente revertidas em células ativadas (CFC 5 dias, figura 5.3 C LTA).

Na presença de patógenos que podem ser detectados por meio da ativação celular pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos, ocorre a indução da produção de mediadores inflamatórios (Yamaji et al., 1995; Tsai et al., 2005). Os receptores tipo Toll (TLRs) reconhecem os subprodutos oriundos de microrganismos que estimulam a imunidade inata e são conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e induzem a expressão de vários mediadores da inflamação como citocinas e quimiocinas via ativação de Nuclear Factor (NF)- κ B, um fator de transcrição responsável pela expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (Abbas et al., 2012a). O LTA é reconhecido por receptores TLR2 que ativam a célula como resultado levando à expressão de citocinas. Muitas citocinas são detectadas durante a inflamação, entre elas estão IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α (fator de necrose tumoral) (Zehnder et al., 2003). Uma vez eliminado o agente causador, as células passam a produzir citocinas com perfil anti-inflamatório como TGF- β e IL-10 (Abbas et al., 2012b).

Piazzon et al. (2014) em estudo com a IL-10 observaram a ação anti-inflamatória nos fagócitos, promoção de proliferação de células T de memória, indução da diferenciação celular de linfócitos B e a secreção de anticorpos.

Citocinas como TGF β 1 e IL-10 regulam uma variedade de processos biológicos, incluindo diferenciação, proliferação, reparação tecidual, inflamação e defesa do hospedeiro, no entanto sua expressão aberrante pode induzir muitos tipos de doenças auto-imunes e formação de tumores (Chang et al., 2014).

Neste estudo, observou-se aumento significativo da atividade mitocondrial de células ativadas previamente com LTA, sugerindo, pela natureza do ensaio, aumento de seu metabolismo ou proliferação. Com base nestas observações, sugere-se que a ativação celular seguida da remoção do estímulo levou à produção de TGF- β e IL-10 resultando em possível proliferação celular (Abbas et al., 2012b).

Apesar dos resultados terem demonstrado atividade mitocondrial superior das células previamente ativadas, deve-se considerar que este estudo não avaliou possíveis alterações fenotípicas e funcionais que podem tê-las afetado e que possivelmente teriam significado biologicamente importante. A ocorrência destas alterações deverá ser abordada em estudos futuros de nosso grupo.

O óxido nítrico é uma molécula mensageira intracelular (Bredt; Snyder, 1990) de grande importância nos processos fisiológicos e patológicos e está envolvido no controle do crescimento celular, diferenciação, apoptose, vasodilatação e neurotransmissão. Quando presente em altas concentrações, pode atuar como potente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos (Fouad, 2002). A indução da isoforma da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pode inibir a proliferação de fibroblastos e induzir a morte celular, o que contribui para o desequilíbrio entre destruição e reparo tecidual (Kendall et al., 2002). Isso ocorre em processos inflamatórios, em que há um aumento da síntese de NO, como demonstrado em casos de pulpíte (Di Nardo Di Maio et al., 2004). Quando presente em pequenas quantidades, o NO presente no leito vascular regula o relaxamento muscular e protege contra a adesão de leucócitos e plaquetas na parede do vaso sanguíneo, podendo ser considerada uma molécula protetora e anti-inflamatória (Fouad, 2002).

No presente estudo, podemos observar que as três medicações testadas foram capazes de induzir a produção de NO por células de papila. A pasta tripla antibiótica modificada resultou em produção mais significativa de NO por células ativadas em concentrações menores da medicação. O CFC modificado induziu níveis maiores deste mediador por células ativadas especialmente nos períodos experimentais mais longos (Figura 5.6 C e D). De forma interessante, o CFC induziu maiores níveis de NO em células não ativadas na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que células ativadas produziram níveis maiores na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5.7).

Observou-se claramente uma maior influência desta medicação em condição pró-inflamatória e uma relação de dependência entre produção de nitrito e o tempo para ambos os grupos em todos os tempos experimentais.

Foi comum para todas as medicações empregadas o aumento da produção de nitrito em determinadas concentrações com o passar do tempo. Com o uso da pasta tripla antibiótica modificada essa relação foi observada em algumas concentrações consideradas baixas e não foi observada grandes diferenças entre a produção de nitrito entre os ambientes. Já com o CFC modificado houve aumento da produção principalmente em ambiente pró inflamatório dessa medicação exposta a maior concentração, mostrando uma maior interação desta medicação nesta concentração neste ambiente nos dois últimos tempos experimentais. Com o CFC em ambos ambientes houve maior produção de nitrito com o decorrer do tempo, porém em ambiente inflamatório a produção teve relação diretamente proporcional com o aumento da concentração.

Com base nos resultados obtidos a partir do presente estudo, podemos sugerir que a medicação CFC modificado apresentou resultados mais favoráveis com relação à viabilidade celular e produção de NO em comparação com CFC que por sua vez se apresentou mais favorável que a pasta tripla antibiótica modificada. A pasta pode ser preparada em uma concentração conhecida (ideal) ou com base em sua consistência. Entretanto, pela conveniência do emprego de pastas cremosas rotineiramente, é importante que se considere a toxicidade que altas concentrações de substâncias antimicrobianas possam exercer às células da papila apical ou do periodonto.

Neste trabalho, pode-se demonstrar ainda que o efeito de medicações intracanal é dependente da concentração, do tempo de contato e da condição prévia da célula presente no remanescente tecidual. Juntamente com outras evidências científicas, é importante salientar a importância da concentração de medicação empregada clinicamente uma vez que as mesmas são utilizadas por longos períodos de tempo e são aplicadas sobre células previamente alteradas pela instalação de processos inflamatórios de forma que somados, estes efeitos poderão resultar em agressões ainda maiores para o tecido periapical podendo comprometer a qualidade do tecido a ser formado na tentativa de indução de regeneração endodôntica.

7 CONCLUSÕES

Do presente estudo pode-se concluir:

- ✓ O subproduto bacteriano, ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis*, influenciou a atividade mitocondrial das células da papila apical expostas à pasta tripla modificada, ao CFC e ao CFC modificado, promovendo possível aumento do metabolismo ou proliferação celular em relação ao ambiente fisiológico.
- ✓ Dentre as medicações estudadas, o CFC modificado apresentou menor efeito citotóxico sobre a viabilidade das células da papila apical nos tempos experimentais estudados.
- ✓ O CFC promoveu diminuição da viabilidade celular na sua concentração maior em ambas condições celulares.
- ✓ A pasta tripla antibiótica modificada em altas concentrações levou a diminuição significativa da viabilidade em ambos ambientes e foi considerada a mais citotóxica neste estudo.
- ✓ As medicações CFC modificado, CFC e pasta tripla antibiótica modificada induziram a produção de óxido nítrico em um padrão dependente da condição celular, tempo de contato e concentração da medicação testada.

REFERÊNCIAS¹

Abbas A, Lichman A, Pillai S. Imunidade inata. *Imunologia celular e molecular*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012a. p. 55-87.

Abbas A, Lichman A, Pillai S. Tolerância imunológica e autoimunidade. *Imunologia celular e molecular*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012b. p. 328-9.

Althumairy R, Teixeira FB, Diogenes A. The effect of dentin conditioning with medicaments used in regenerative procedures on the survival of SCAP. *J Endod*. 2014 Apr;40(4):521-5.

AAE- American Association of Endodontics. Considerations for Regenerative Procedures [citado 1 out. 2013]. Disponível em: <http://www.aae.org/clinicalresources/regenerativeendodontics/considerations-for-regenerativeprocedures.aspx>.

Anvisa. Antimicrobianos- bases teóricas e uso clínico. 2014a [citado 15 nov. 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinilonas.htm#.

Anvisa. Antimicrobianos- bases teóricas e uso clínico. 2014b [citado 15 nov. 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cefalosporinas2.htm.

Anvisa. Antimicrobianos- bases teóricas e uso clínico. 2014c [citado 15 nov. 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/tetraciclinas2.htm.

Anvisa. Fármacos utilizados em infecção. 2014d [citado 15 nov. 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/Infeccao.html#_Toc24793933

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Asgary S, Eghbal M, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):243-50.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200.

Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian J Dent Res*. 2011 Feb;22(1):122-31.

Baumotte K, Bombana AC, Cai S. Microbiologic endodontic status of young traumatized tooth. *Dent Traumatol*. 2011 Dec;27(6):438-41.

Berkhoff J, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod*. 2014 Aug;40(8):1172-7.

Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(7):749-64.

Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J. Endod*. 2009 Oct;35(10):1343-9.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Jan;87(2):682-5.

Bruserud O, Wendelbo O, Paulsen K. Lipoteichoic acid derived from *Enterococcus faecalis* modulates the functional characteristics of both normal peripheral blood leukocytes and native human acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol*. 2004 Nov;73(5):340-50.

Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985 Jan;18(1):35-40.

Carmignani M, Volpe A, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, Felaco M. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci*. 2000 Dec 15;68(4):401-15.

Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1327-30.

Chandrasah S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature *ex vivo* human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1236-9.

Chang TP, Kim M, Vancurova I. Analysis of TGF β 1 and IL-10 transcriptional regulation in CTCL cells by chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*. 2014;1172:329-41.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J*. 2012 Mar;45(3):294-305.

Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):160-4.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006 Dec;32(12):1205-13.

Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: na *in vitro* study. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):813-9.

Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Nov;210(2):93-101.

Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J*. 1998 Aug;43(4):250-6.

Conselho Federal de Farmácia. Benzimidazol e metronidazol. 2014 [citado 15 nov. 2014]. Disponível em: <http://www.cff.org.br/pagina.php?id=566>.

Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*. 2008 May;34(5):611-6.

Craig RG. Restorative dental materials. St. Louis: Mosby-Year Book; 1997.

Cvek M. Prognosis of luxated non- vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. Endod Dent Traumatol.1992 Apr;8(2):45-55.

Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. Odontol Revy. 1972;23(1):27-44.

Di Nardo Di Maio F, Lohinai Z, D'Arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis MA, et al. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. J Dent Res. 2004 Apr;83(4):312-6.

Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. J Endod. 2009 May;35(5):745-9.

Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. J Endod. 2014 apr;40(4Suppl):S52-7.

Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. Int Dent J. 2005 Oct;55(5):293-301.

Fouad AF. Molecular mediators of pulp inflammation. In: Hargreaves K, Goodis H, editors. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Carol Stream: Quintessence Publishing; 2002. p. 247-79.

Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, et al. Tissue Reaction to a Triantibiotic Paste Used for Endodontic Tissue Self-regeneration of Nonvital Immature Permanent Teeth. J Endod. 2012 Jan;38(1):91-4.

Gomes-Filho JE, Duarte PC, Ervolino E, Mogami Bomfim SR, Xavier Abimussi CJ, Mota da Silva Santos L, et al. Histologic characterization of engineered tissues in the canal space of closed- apex teeth with apical periodontitis. J Endod. 2013 Dec;39(12):1549-56.

Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. J Am Dent Assoc 2008 Apr;139(4):457-65.

Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006 May;27(14):2865-73.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5.

Hahn CL, Falkler WA, Jr., Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*. 1991;36(2):147-53.

Hale MS. Autogenous Transplants. *J Am Dent Assoc*. 1954 Aug;49(2):193-8.

Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*. 2008 Jul;34(7 Supply):S51-6.

Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc*. 1975 Jul;8(2):74-93.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):161-6.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*. 1996 Mar;29(2):125-30.

Huang GT, Lin LM. Letter to the editor: comments on the use of the term "revascularization" to describe root regeneration. *J Endod*. 2008 May;34(5):511-2.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Lin H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/ dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):645-51.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol*. 2011 Feb;27(1):55-8.

Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods- a retrospective study. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1330–6.

Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1823-33.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007 Sep;21;130(6):1071-82.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):876-87.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9.

Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus spp.* In endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):851-6.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Res Oral Biol Med*. 2004 Sep 1;15(5):308-20.

Kendall HK, Marchal RI, Batold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. 2002 Jan;7(1):2-10.

Kiechele FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*. 1993 Nov;100(5):567-75.

Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod*. 2010 Jun;36(6):1086-91.

Kobayashi M, Kagawa T, Takano R, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Effect of medium pH on the cytotoxicity of hydrophilic statins. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10(3):332-9.

Lage-Marques JLS, Antoniazzi, JH. Quando a medicação é fundamental para sucesso da terapia endodôntica. In: Riad Gorob, organizadora. Atualização na Clínica Odontológica. São Paulo: Arantes Médicas; 2000. Capítulo 1, p. 59-89.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993 May 14;260(5110):920-6.

Law AS. Considerations for Regeneration Procedures. J Endod. 2013 mar;39(3 Suppl):S44-S56.

Law AS. Outcomes of Regenerative Endodontic Procedures. Dent Clin North Am. 2012 Jul;56(3):627-37.

Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. J Endod. 2012 Mar;38(3):411-4.

Lieberman J, Trowbridge H. Apical closure of non- vital permanent incisor teeth where no treatment was performed: case report. J Endod. 1983 Jun;9(6):257-60.

Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. J Endod. 2011 Feb;37(2):133-8.

Masiero AV, Tavares AR, Beumer J, et al. CFC: uma alternativa para as infecções endodônticas resistentes? Rev Bras Odontol. 2010;67:123-7.

Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2009 Jul;42(7):555-67.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011 Aug;44(8):697-730.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. Eur J Oral Sci. 2004 Jun;112(3):207-15.

Morandini AC, Chaves Souza PP, Ramos- Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Souza Costa CA, et al. Toll-like receptor 2 knockdown modulates interleukin (IL)-6 and IL-8 but not stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2013 Apr;84(4):535-44.

Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1 alpha, stromal-derived factor-1 and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):310-7.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res.* 2011 Mar-Apr;25(2):157-62.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007 Apr;33(4):377-90.

Myers HI, Flanagan VD. A comparison of results obtained from transplantation and replantation experiments using Syrian hamster teeth. *Anat Rec.* 1958 Mar;130(3):497-513.

Nagata JY, Gomes BPF, Lima TFR, Murakami LS, de Faria DE, Campos GR, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod.* 2014a May;40(5):606-612.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod.* 2014b Jun;40(6):778-83.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 Sep;6(12):3051-64.

Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Nov 1;16(7):997-1004.

Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J. Endod.* 2012 Oct;38(10):1428-34.

Nosrat A, Li KL, Vir K, Hicks ML, Fouad AF. Is pulp regeneration necessary for root maturation? *J Endod.* 2013 Oct;39(10):1291-5.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):562–7.

Nygaard-Ostby B. The Role of the blood clot in Endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontol.* 1961 Dec;19:324-53.

Ohman A. Healing and sensitivity to pain in young replanted human teeth: an experimental, clinical and histological study. *Odontol Tidskr.* 1965 Apr 15;73:166-227.

Okiji T. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves K, Goodis H, editors. *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Carol Stream: Quintessence Publishing; 2002. p. 95-122.

Pafford EM. Homogeneous transplants of preserved frozen teeth; a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Pathol.* 1956 Jan;9(1):55-70.

Pereira JC. Tratamentos conservadores da viabilidade pulpar: princípios biológicos e clínicos. *Biodonto.* 2004;2(2):1-100.

Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent.* 2007 May-Jun;86(3):33-5.

Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010 Mar;36(3):536-41.

Phumpatrakom P, Srisuwan T. Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3-antibiotic mixture. *J Endod.* 2014 Mar;40(3):399-405.

Piazzon MC, Savelkoul HF, Pietretti D, Wiegertjes GF, Forlenza M. Carp Il10 has anti-inflammatory activities on phagocytes, promotes proliferation of memory t cells,

and regulates b cell differentiation and antibody secretion. J Immunol. 2014 Nov;21.pii:1402093.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. Int Endod J. 2009 Jan;42(1):84-92.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88.

Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. J Endod. 2008 Dec;34(12):1474-9.

Roças IN, Siqueira Jr JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol. 2008 Nov;46(11):3599-606.

Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. J Endod. 2012 Oct;38(10):1372-5.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod 1993 Feb;19(2):76-8.

Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. Oral Microbiol Immunol. 1993 Jun;8(3):172-6.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontics patients using culture and PCR. J Endod. 2006 Feb;32(2):104-9.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. Oral Microbiol Immunol. 2004 Apr;19(2):95-101.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. J Endod. 2008 Aug;34(8):919-25.

Shimizu E, Ricucci D, Albert J, Alobaid AS, Gibbs JL, Huang GT, et al. Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. *J Endod*. 2013 Aug;39(8):1078-83.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009 Dec;42(12):1118-26.

Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*. 2000 May;66(5):1953-9.

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* 2007 Mar;40(3):186-97.

Sipert CR. Produção de MIP-1 alfa e SDF-1 por fibroblastos de polpa dental humana em cultura frente ao desafio com *Enterococcus faecalis* inativado por calor [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.

Sipert CR, Moraes IG, Bernadinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):91-4.

Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, Campanelli AP, et al. *In Vitro* regulation of CCL3 and CXCL12 by Bacterial by-products Is dependent on site of origin of Human Oral Fibroblasts. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):95-100.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008 Nov; 34(11):1291-301e3.

Skoglund A, Tronstad L. Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod*. 1981 Jul;7(7):309-16.

Soares AJ, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):417-20.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS ONE. 2006 Dec 20;1:e79.

Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Roméas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. J Dent Res. 2008 Mar;87(3):256-61.

Takeut MI, Lage-Marques JLS, Antoniazzi, JH. Penetração dentinária da associação hidróxido de cálcio, ciprofloxacina e metronidazol variando o veículo. RPG. 1997;(4):146-52.

Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. Pediatr Dent. 2009 Mar-Apr;31(2):145-8.

Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. J Endod. 2007 Jun;33(6):680-9.

Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. Pediatr Dent. 2007 Jan-Feb;29(1):47-50.

Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics biologically based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. Aust Dent J. 2010 Dec;55(4):446-52.

Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. J Endod. 2003 Mar;29(3):170-5.

Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. J Endod. 2011 Feb;37(2):265-8.

Trope M. Treatment of immature tooth with a non- vital pulp and apical periodontitis. Dent Clin N Am. 2010 Apr;54(2):313-24.

Trope M, Ray HL Jr. Resistance to fracture of endodontically treated roots. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992;73:99-102.

Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2005 Dec;31(12):860-2.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):56-63.

Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 2001 Aug;86(2):203-9.

Whittle M. Apexification of an infected untreated immature tooth. *J Endod.* 2000 Apr;26(4):245-7.

Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol.* 2003 Oct;14(8):10-3.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):715-21.

Windley III W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):439-43.

Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1995 Sep;63(9):3576-81.

Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression-part of host defense in pulpitis. *Cytokine.* 2003 May;22(3-4):84-8.

Zeichner- David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, et al. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn.* 2003 Dec;228(4):651-63.

Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087.

Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with ou without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. J Endod. 2006 Aug;32(8):722-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS EM PROCEDIMENTOS ENDODÔNTICOS REGENERATIVOS NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DA PAPILA APICAL IN VITRO

Pesquisador: Aline Pereira Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26843914.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 569.110

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

A Terapia Endodôntica Regenerativa é uma opção de tratamento para dentes com rizogênese incompleta acometidos por periodontite apical. Para o sucesso do tratamento, é necessário que se proceda a antissepsia do canal radicular por meio de substâncias químicas e pastas medicamentosas. Estas, por sua vez, devem possibilitar a proliferação do remanescente vital e células precursoras da papila apical para a obtenção da revascularização tecidual. Sendo assim, é importante que tais substâncias antissépticas não interfiram na viabilidade dessas células.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vitro a citotoxicidade de medicações utilizadas em Procedimentos Endodônticos Regenerativos sobre células de papila apical humana em condição basal ou em ambiente pró-inflamatório

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão apresentados na proposta de maneira correta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é interessante, executável e atende os preceitos éticos.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 569.110

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados carta de autorização da clínica da FOUSP e TCLE conforme exigido pelo CEP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 26 de Março de 2014

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazovic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br