ALESSANDRA FONSECA GAMBINI NOGUEIRA

**Estudo *in vitro* do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação
de fibroblastos de ligamento periodontal**

São Paulo
2017

ALESSANDRA FONSECA GAMBINI NOGUEIRA

**Estudo *in vitro* do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação
de fibroblastos de ligamento periodontal**

Versão Original

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Renata Sipert

São Paulo

2017

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

Nogueira, Alessandra Fonseca Gambini.

Estudo *in vitro* do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação de fibroblastos de ligamento periodontal / Alessandra Fonseca Gambini Nogueira ; orientador Carla Renata Sipert. -- São Paulo, 2017.

59 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 original

1. Fibroblastos. 2. Ligamento periodontal. 3. Endodontia. I. Sipert, Carla Renata.
II. Título.

Nogueira AFG. Estudo *in vitro* do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação de fibroblastos de ligamento periodontal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Liliana e Ciro, razões de eu chegar onde estou e ser o que sou.

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

A minha irmã Maria Beatriz por sempre acreditar em mim.

Ao meu avô Mario, que deve estar muito feliz onde quer que ele esteja

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me conduzir pelo melhor caminho;

Aos meus pais, Liliana e Ciro, 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 Carlos, obrigada por todo amor, carinho e, principalmente, paciência nessa fase;

A minha irmã Maria Beatriz, minha grande amiga que, apesar da distância, compartilho todos momentos da minha vida;

Aos meus grandes amigos da pós-graduação: Sandra, Laís, Leonardo, Alexandre, Hector, Breno, Priscila, Yeska, Laura, Edgard, Fernanda. Amizades que vou levar para o resto da vida. Vocês fizeram essa fase de muito estudo ser mais leve e divertida;

Aos meus amigos pessoais: Sandra, Lorena, Nágila, Juliana, Carlota, Roberta, Laila e Fernanda pelo incentivo de sempre;

A minha orientadora professora Dra. Carla Renata Sipert pela oportunidade de trabalhar contigo, pela assistência, pelos conhecimentos concedidos e pela amizade;

Ao meu co-orientador professor Dr. Marcelo dos Santos por todos os ensinamentos dos últimos anos;

Aos professores da minha banca examinadora: Profa Dra. Mary Caroline Skelton Macedo e Prof. Dr. Harry Davidowicz. Obrigada por aceitarem o convite;

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;

À professora Dra. Márcia Martins Marques, por permitir o uso de seu laboratório para minha pesquisa;

À turma do Laboratório de pesquisa Básica do Departamento de Dentística: funcionária Débora e os alunos: Lucas, Emanuel, e Ana Clara pela companhia e pela troca de conhecimentos para aprimorar esta pesquisa;

Aos funcionários do Departamento de Dentística: Selma, Aldo e David sempre muito prestativos;

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

Ao Marcos (xerox) sempre muito prestativo e eficiente.

“Você sabe que encontrou a felicidade quando vive um
momento que não quer que acabe”

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

Nogueira AFG. Estudo *in vitro* do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação de fibroblastos de ligamento periodontal [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

A obturação do canal radicular é uma etapa fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico. É desejável que os materiais empregados nesta fase não interferiram negativamente com o reparo tecidual, mas preferencialmente estimulem a regeneração dos tecidos periapicais. Recentemente, cones de gutapercha combinados com material biocerâmico foram desenvolvidos com esta finalidade. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial citotóxico e biomodulador de cones de gutapercha convencionais, de cones de gutapercha contendo biocerâmica e de cones de polímero sobre células de ligamento periodontal *in vitro*. Cultura de fibroblastos de ligamento periodontal foi estabelecida a partir de terceiro molar humano. As células foram estimuladas com extratos de cones de gutapercha convencional, de cones de gutapercha contendo biocerâmica e de cones de polímero em diluição seriada para teste de viabilidade celular por meio do método MTT (Brometo de Difeniltetrazólio 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) após 72 h. Em seguida, a diluição de 1/5 foi empregada para estimulação das células por 72 h para detecção da expressão gênica de colágeno tipo I e proteína cementária 1 (CEMP-1) por RT-qPCR. Os dados foram estatisticamente analisados por meio de ANOVA sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados observados de forma que, em extrato puro em extrato puro 1:1, houve comprometimento da viabilidade celular tanto para o extrato de cone de gutapercha quanto para o extrato do cone Cpoint podendo ser considerados citotóxicos. Nas outras diluições não houve diferença significativa neste parâmetro. Em relação à expressão gênica de colágeno, não foram observadas diferenças significativas quando da presença dos extratos. Para CEMP-1, significativa indução da expressão gênica foi observada para o cone de gutapercha. Conclui-se, através da análise dos resultados, que o cone de gutapercha e o cone de polímero são os mais citotóxicos em extrato puro, porém a gutapercha foi o único material que induziu uma expressão significativa de CEMP-1 que auxilia no reparo tecidual. O Col1 não foi

induzido em nenhuma das amostras, porém também não foi inibido que indica que nenhum dos 3 tipos de cone interfere no reparo tecidual.

Palavras-chave: Fibroblastos. Ligamento periodontal. Endodontia.

ABSTRACT

Nogueira AFG. In vitro study of the effect of endodontic obturation points on the biomodulation of periodontal ligament fibroblasts [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

Root canal obturation is a fundamental step for successful endodontic treatment. It is desirable that the materials employed at this stage did not adversely interfere with tissue repair but rather stimulate the regeneration of the periapical tissues. Recently, gutta-percha points combined with bioceramic materials were developed for this purpose. Thus, the objective of this study was to investigate the cytotoxic and biomodulatory potential of conventional gutta-percha points, gutta-percha points containing bioceramics and polymer points on periodontal ligament cells *in vitro*. Culture of periodontal ligament fibroblasts was established from one human third molar. The cells were stimulated with extracts of cones of conventional gutta-percha points, gutta-percha containing bioceramics and polymer points in serial dilution for cell viability test using the MTT assay [Diphenyltetrazolium Bromide 3- (4,5)]. Next, the 1/5 dilution was used to stimulate the cells for 72 h to detect the gene expression of type I collagen and cement protein 1 (CEMP-1) by RT-qPCR. Data were statistically analyzed by means of ANOVA being considered significant values of $p < 0.05$. The results observed was that in a pure 1: 1 extract, there was impairment of cell viability for both the gutta-percha cone extract and the Cpoint cone extract and could be considered cytotoxic. At the other dilutions, no significant difference on this parameter was observed. Regarding the gene expression of collagen, no significant differences were observed at the presence of extracts. For CEMP-1, significant induction of gene expression was observed for gutta-percha points. In conclusion, the analysis of the results showed that the gutta-percha and polymer points are the most cytotoxic at pure extract, however gutta-percha was the only material that induced a significant expression of CEMP-1 which assists the tissue repair. Col1 was not induced in any of the samples but was also not inhibited indicating that none of the 3 cone types interfere in tissue repair.

Keywords: Fibroblasts. Periodontal Ligament. Endodontics.

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	Biocerâmico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	Ciclo limiar
CEMP1	Proteína cementária 1
COL1	Colágeno tipo 1
CO2	Dióxido de Carbono
CP	Cone de polímero
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GP	Guta Percha
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTT	Brometo de Difeniltetrazólio 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)
Nm	Nanômetro
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Biocompatibilidade e Citotoxicidade	24
2.2	Outros Materiais para Confeção de Cones de Obturação	31
2.3	COL1	32
2.4	CEMP1	33
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5	RESULTADOS	41
5.1	Viabilidade celular	41
5.2	Expressão gênica de colágeno I e proteína cementária 1	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

Os materiais odontológicos podem ter uma grande influência sobre os tecidos do periodonto, pois seus compostos tóxicos podem iniciar uma irritação nos tecidos vizinhos, interferir no processo de reparo ou causar uma reação alérgica. Os materiais utilizados nos procedimentos endodônticos devem ser escolhidos com critério para que a possibilidade de causarem uma reação periapical possa ser reduzida ou evitada. A maioria dos materiais obturadores impede ou altera o crescimento de vários tipos de células (Keiser et al., 2000; Hernandez et al., 2005) e pelo fato desse crescimento celular ser estritamente regulado pela progressão do ciclo celular, a interferência nesse ciclo por materiais quimicamente tóxicos pode levar à sua inibição, citotoxicidade e até apoptose (Eastman; Rigas, 1999).

Um material obturador ideal deve ser fácil de ser introduzido no canal radicular; deve obliterar o canal, tanto lateral como apicalmente; depois de inserido, não deve apresentar contração; deve ser impermeável à umidade; deve ser bacteriostático ou pelo menos impróprio ao crescimento microbiano; deve ser radiopaco; não deve manchar a estrutura dentinária; deve ser estéril ou passível de ser esterilizado de modo fácil e rápido; não deve irritar o tecido periapical e deve ser de fácil remoção do canal radicular, quando isto se fizer necessário (Grossman, 1976).

Outros pré-requisitos são: prevenir infiltração (Gartner; Dorn, 1992), ter estabilidade dimensional, aderência as paredes da cavidade, resistência à reabsorção e umidade (Torabinejad et al., 1995b); também deve ser não tóxico e biocompatível para promover o reparo (Torabinejad et al., 1995a) e não causarem uma reação inflamatória nos tecidos periapicais (Kolokuris et al., 1996; Huang et al., 2002).

De acordo com Seltzer (1971), de um ponto de vista histológico, a cura endodôntica se dá a partir do fechamento do forame apical adjacente ao material obturador como uma barreira de tecido duro como cimento na ausência de inflamação. Sendo assim, os materiais obturadores devem criar um ambiente

favorável à cura dos tecidos periapicais danificados pela doença instalada no tecido pulpar e periapical.

Os fibroblastos do ligamento periodontal são as principais células envolvidas na resposta celular aos materiais obturadores porque mais comumente são eles que se arranjam ao redor desses materiais, e não os osteoblastos (Lowenberg et al., 1986).

A Guta-Percha é um material termoplástico derivado do látex extraído de árvores da família das sapotáceas. Este material é um polímero do metibutadieno ou isopreno (1,4 poliisopreno), apresentando um isomerismo com a borracha. Muitos produtos hoje encontrados comercialmente podem, na verdade, não utilizar a gutapercha como matéria prima. Alguns fabricantes utilizam a balata, extraída da árvore *Manilkara bidentata*, da família das sapotáceas, habitualmente encontradas na região da Amazônia. A verdadeira gutapercha é obtida a partir da coagulação do látex de árvores encontradas principalmente na Malásia, dos gêneros *Paysonia* ou *Palaquium*, também da família das sapotáceas. Tem sido relatado que a gutapercha e a balata apresentam propriedades físicas e químicas idênticas (Cohen; Hargreaves, 2011).

Em 1942, Bunn relatou que, quimicamente, a gutapercha pode ser encontrada em duas formas distintas: a alfa e a beta. A forma alfa é a originalmente extraída da árvore. Entretanto a grande maioria das gutaperchas disponíveis no mercado encontra-se na forma beta. Ambas as formas cristalinas são transpoliisoprenos e diferenciam-se na configuração da ligação dupla e na distância molecular repetida, que é de 8,8 ângstrons para a fase alfa e 4,7 ângstrons para a fase beta. A gutapercha na forma alfa-cristalina é quebradiça à temperatura ambiente, e torna-se pegajosa, aderente e com maior escoamento quando estimulada por onda de calor. Sua temperatura de fusão é de 65°C. A gutapercha na forma beta-cristalina é estável e flexível à temperatura ambiente. Quando estimulada por calor, perde características de adesividade e apresentam menor escoamento do que a forma alfa. Sua temperatura de fusão é de 56°C.

Quando comparado a outros materiais obturadores tais como cimento endodôntico a base de óxido de zinco e eugenol, cimento endodôntico a base de resina epóxi e ao hidróxido de cálcio como medicação intracanal, a gutapercha mostra-se como o mais biocompatível dentre os materiais obturadores (Ranade; Kamra, 2003).

O cone de gutapercha modificado por material biocerâmico consiste na adição de materiais bioativos em sua composição para que ocorra maior biocompatibilidade aos tecidos periapicais e maior adesão às paredes do canal (Jitaru et al., 2016).

Já os cones de polímero foram desenvolvidos como intuito de que haja expansão dimensional na presença de umidade para que não haja espaços entre o material obturador e as paredes do canal radicular. Eid et al. (2013) compararam a biocompatibilidade dos cones de gutapercha convencionais com os cones de polímero CPoint e observaram resultados muito parecidos entre eles.

No decorrer da evolução tecnológica da Endodontia, muito se investigou a respeito de dispositivos e técnicas para preparo, irrigação e obturação de canais radiculares. No entanto, a literatura adota de maneira consensual o conceito de biocompatibilidade à gutapercha. Considerada como inerte aos tecidos periapicais, poucos estudos investigam o potencial de biomodulação desta substância bem como de novos materiais propostos com a mesma finalidade. Considerando o questionamento levantado por Pascon e Spångberg em 1990 a respeito da real neutralidade da gutapercha, este estudo objetiva investigar a citotoxicidade de materiais obturadores empregados na Endodontia contemporânea bem como sua capacidade de modular a função das células dos tecidos periapicais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A guta-percha foi cientificamente classificada em 1843 quando descobriu-se ser um termoplástico natural com várias utilidades. Durante a segunda metade do século 19, a guta-percha foi usada para fins domésticos e industriais. Também foi utilizada para isolamento de cabos de telégrafo subaquáticos pois acreditavam ser um material inerte. Quimicamente, a guta-percha é um poliisopreno (trans-1,4-poliisopreno) cuja estrutura *cis* é o elastômero de látex comum. Enquanto as borrachas de látex são amorfas na estrutura molecular, a guta-percha cristaliza, levando a um material mais rígido. A mesma bioinércia que o tornou adequado para cabos marinhos também indica que esse material não causa reação quando utilizado no corpo humano, portanto tem sido usado em uma variedade de dispositivos cirúrgicos e durante o tratamento de canal radicular. As suas propriedades físicas e químicas, incluindo, mas não limitadas à sua inércia e biocompatibilidade, ponto de fusão, ductilidade e maleabilidade, tornam-na importante na endodontia. Prakash et al. (2005) fizeram um relato da história da guta-percha e conta que ela foi introduzida pela primeira vez na odontologia como material temporário de obturação por Edwin Truman. Em 1847, Hill desenvolveu "*Hill's-stopping*": um material restaurador formado por uma mistura de guta-percha, carbonato de cálcio e quartzo 13. Em 1867, Bowman foi o primeiro a usar a guta-percha para o preenchimento do canal radicular. Perry, em 1883, usou fio de ouro pontiagudo envolto em guta-percha macia e colocado dentro do canal. No ano de 1887, a S.S White Company foi a primeira a iniciar a fabricação comercial de cones de guta-percha. Em 1893, Rollins usou guta-percha com óxido de mercúrio puro no preenchimento do canal radicular. Callahan, em 1914, introduziu o amolecimento e dissolução da guta-percha com resinas para remoção após a obturação. Ingle e Levine (1959) foram os primeiros a propor a padronização dos instrumentos e dos materiais obturadores. O uso dos cones de guta-percha padronizados foi introduzido após a 2ª Conferência de Endodontia na Philadelphia. A partir daí, houve um grande desenvolvimento da terapia do canal radicular como especialidade. Embora vários métodos foram, desde então, introduzidos, a guta-percha continua a ser o principal material utilizado para obturações do sistema de canais radiculares.

2.1 Biocompatibilidade e Citotoxicidade

Pascon e Spångberg (1990) avaliaram a toxicidade dos cones de gutapercha pelo teste de liberação de radiocromo já que observaram o uso em larga escala deste material na obturação endodôntica. Foram utilizados neste estudo 14 marcas comerciais de gutapercha e 3 gutaperchas em fase experimental. Base de gutapercha, óxido de zinco e sulfato de bário, que foram considerados componentes principais dos cones de GP, e íons de zinco também foram avaliados. O material foi utilizado após de ser dissolvido em clorofórmio ou aquecido e colocado em poços de cultura. Uma suspensão de células de ligamento periodontal foi adicionada aos poços. Após incubação a 37° C durante 4 e 24 h, o radiocromo extracelular no meio de cultura foi medido. A liberação espontânea de radiocromo foi utilizada como controle e os resultados foram considerados estar dentro dos limites normais, quer a 4 ou 24 h. Todas as amostras de GP dissolvidas em clorofórmio apresentaram baixa toxicidade após 4 h, enquanto as amostras de GP aquecida apresentaram diferenças estatisticamente significativas após 4 h. Tanto a GP dissolvida como aquecida foram tóxicas após 24 h. As matérias-primas e o sulfato de bário não eram tóxicos, enquanto que os óxidos de zinco e zinco apresentavam uma toxicidade acentuada. Todos os cones de GP testados foram tóxicos em períodos de observação mais longos e a toxicidade foi atribuída ao vazamento de íons de zinco nos fluídos.

Breault et al. (1995) notaram que, até a presente data, haviam muito poucos estudos relacionados aos possíveis efeitos da terapia endodôntica sobre a regeneração do ligamento periodontal perdido, portanto examinaram os efeitos de medicamentos endodônticos sobre a fixação de fibroblastos em superfícies dentinárias livres de *smear layer*. As câmaras pulpares dos terceiros molares extraídos foram preenchidas com um dos seguintes medicamentos: gutapercha com óxido de zinco e cimento à base de eugenol, gutapercha quente com cimento, gutapercha quente sem cimento, hidróxido de cálcio, formocresol ou deixado vazio. Uma área de superfície de dentina pré-determinada foi então inoculada com fibroblastos gengivais humanos a

uma concentração de 2×10^4 células por ml. As células foram deixadas aderir à superfície da dentina durante 4 ou 24 horas. Determinou-se que a fixação de fibroblastos foi significativamente reduzida quando exposta a formocresol ou guta-percha quente sem cimento, tanto no intervalo de 4 e 24 horas. Isso sugere que o uso de formocresol ou guta-percha quente sem cimento em um canal radicular pode impedir a cicatrização e regeneração do tecido periodontal.

Osório et al. (1998) utilizaram um modelo de cultura celular *in vitro* de fibroblastos gengivais humanos e células L-929 para medir a citotoxicidade dos cimentos obturadores de canal radicular Endomet, CRCS e AH26 e materiais de vedamento apical Amálgama, Gálio GF2, Ketac Silver, agregado de trióxido mineral (MTA) e Super-EBA. Os efeitos citotóxicos foram avaliados utilizando o ensaio MTT para a atividade enzimática mitocondrial e o ensaio CV para o número de células. A análise estatística dos resultados mostrou que o CRCS era o selador menos citotóxico seguido por Endomet e AH26. Entre os materiais de vedamento apical, o MTA não era citotóxico; O Gálio GF2 apresentou pouca citotoxicidade; E Ketac Silver, Super-EBA e Amálgama apresentaram níveis mais altos de citotoxicidade.

Witherspoon e Guttman (2000) analisaram a resposta de cicatrização à guta-percha e ao Diaket (3M ESPE) quando utilizados como material retrobturador em cirurgia perirradicular. Após 55 dias, os resultados foram analisados. Não houve significância estatística na resposta de cura entre Diaket e guta-percha nas seguintes categorias: resposta inflamatória, angiogênese, reabsorção radicular e deposição de cimento porém houveram diferenças significativas nas categorias deposição óssea e formação de ligamento periodontal onde concluiu-se que o Diaket apresentou melhores propriedade de cura do que a guta-percha.

Szep et al. (2003) propuseram um estudo desenhado para testar a toxicidade celular de 6 cones de guta-percha onde 2 deles eram modificados com medicação (clorexidina e hidróxido de cálcio) em células do ligamento periodontal humano. Os cones colocados em meio de cultura por 72 horas na concentração de 6mg/ml. 5 ml de cada extrato foram colocados em culturas

de fibroblastos, encubados e corados. O cone modificado com clorexidina resultou no maior número de morte celular, com uma diferença estatisticamente significativa perante os outros cones. O cone modificado com hidróxido de cálcio não mostrou diferença significativa em relação aos cones não modificados. Portanto, a modificação de cones com clorexidina, mas não com hidróxido de cálcio, compromete a biocompatibilidade *in vitro* da guta-percha.

Também em 2003, Balto e Al-Nazhan estudaram o comportamento de adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal humano a materiais obturadores tais como amálgama, Super-EBA e guta-percha *in vitro* através de microscopia eletrônica de varredura após cultura. Os resultados obtidos mostraram que a guta-percha é um melhor substrato do que os outros materiais estudados e concluíram que a textura da superfície do substrato influencia na morfologia e na adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal que podem refletir a biocompatibilidade do substrato.

Gorduysus et al. (2007) compararam a citotoxicidade, a apoptose e/ou necrose induzidas e os mecanismos apoptóticos em fibroblastos do ligamento periodontal humano tratados com quatro materiais endodônticos diferentes: o agregado de trióxido mineral White ProRoot (MTA/Dentsply, Tulsa Dental, Memphis, TN), Diaket (ESPE, Seefeld, Alemanha), Endion (VOCO, Cuxhaven, Alemanha) e CYMED 8410 (NANO, Kaohsiung, Taiwan). Os efeitos destes quatro materiais na viabilidade dos fibroblastos PDL foram determinados por ensaio de MTT. As vias apoptóticas foram avaliadas através de vários mecanismos. A exposição a MTA durante 24, 48 e 72 horas não resultou em diferenças significativas na redução no número de células viáveis em comparação com os controles. Estes resultados sugerem que o MTA é um material de obturação muito biocompatível. No entanto, Diaket, Endion e CYMED 8410 são tóxicos para fibroblastos *in vitro*. Determinou-se que a forma principal de morte celular induzida por estes materiais de obturação era apoptose e/ou necrose.

Key et al. (2006) desenharam um estudo avaliou a citotoxicidade dos materiais de obturação do canal radicular Resilon e Epiphany *versus* guta-percha, cimento de Grossman, Thermaseal e Sealapex. Utilizando fibroblastos gengivais humanos, as culturas de fibroblastos foram incubadas durante 1 ou 24 h para testar a citotoxicidade. Os fibroblastos foram então corados com azul de tripano, para determinar o número de células mortas. Resilon era semelhante à guta-percha e ao controle e todos se mostraram biocompatíveis ao fibroblastos. O Epiphany era menos citotóxico do que o Sellman de Grossman nos períodos de 1 e 24 h. Epiphany foi mais citotóxico do que Sealapex no período de 1 h, mas menos citotóxica no período de 24 h. Estes resultados indicaram que o Resilon tinha uma menor citotoxicidade e que Epiphany era mais citotóxico do que os materiais convencionais

Ainda em 2007, Sun et al. investigaram os possíveis efeitos do nanofase do pó de hidroxiapatita sobre a proliferação de células do ligamento periodontal. Verificou-se que estes pós compreendem nanopartículas por microscopia electrónica de transmissão. As células primárias do ligamento periodontal foram cultivadas em hidroxiapatita de partículas densas e hidroxiapatita de partícula nanométrica. Os efeitos na proliferação de células do ligamento periodontal em hidroxiapatita densa e de nanopartículas foram examinados *in vitro* utilizando um ensaio de MTT. Os efeitos intercelulares foram estudados com microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e raios X dispersivos de energia. Além disso, a influência dos dois materiais na diferenciação osteogênica foi determinada através da medição da atividade da fosfatase alcalina e da citometria de fluxo. Os resultados sugerem que a nanofase da hidroxiapatita pode promover a proliferação e diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal e ainda que possa ser utilizado como um agente biorreabsorvível na restauração óssea.

Donadio et al. (2008) realizaram um estudo para avaliar a citotoxicidade dos cones de guta-percha, Activ GP e Resilon em um sistema de cultura celular *in vitro*. Quando as amostras de GP, Activ GP e Resilon foram colocadas em culturas celulares, a viabilidade celular no grupo Resilon foi significativamente maior do que nos grupos GP e Activ GP em qualquer

tempo de teste. Não houve diferença de viabilidade celular entre os grupos GP Activ e GP. A citotoxicidade de GP e Activ GP é maior que a do cone de Resilon. Não houve diferença de viabilidade celular entre Activ GP e GP regular, portanto Resilon tem melhor biocompatibilidade do que GP regular e cones GP Activ. A citotoxicidade do Activ GP é semelhante à do GP regular.

No mesmo ano, Economides et al. (2008) optaram por estudar um novo cone de obturação endodôntica: o Resilon cujo objetivo era substituir guta-percha como um material de obturação. Este estudo avaliou o efeito antiproliferativo do Resilon e dois cones de guta-percha comercialmente disponíveis (Roeko, Dentsply). Foram utilizadas duas linhas de células estabelecidas (L929 e RPC-C2A) para o experimento. A citotoxicidade em ordem decrescente foi: Resilon > guta-percha Roeko > guta-percha Dentsply. Após 24 h de exposição, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os materiais testados em ambas as linhas celulares. Após 48 horas de exposição, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre Resilon e os outros materiais na linha celular L929. Na linha celular RPC-C2A, Resilon foi significativamente mais citotóxica do que a guta-percha Dentsply mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre Resilon e guta-percha de Roeko. A citotoxicidade de Resilon aumentou significativamente de 24 h para 48 h em ambas as linhas celulares. Os cones de Resilon foram mais citotóxicos do que os cones de guta-percha. A citotoxicidade foi dependente do tempo e aumentou após 48 h.

Ainda em 2008, Scotti et al. avaliaram a biocompatibilidade de um sistema de obturação endodôntica à base de resina RealSeal (SybronEndo) comparado à guta-percha utilizando o teste indireto de citotoxicidade. Após 24 e 48 h de incubação, o Real Seal apresentou maior viabilidade celular em comparação com a guta-percha. Após 72 h, a viabilidade celular foi igual para os dois materiais. Os autores sugerem mais estudos para verificar a aplicação clínica do RealSeal.

Christiansen et al. (2009) compararam a cicatrização após a ressecção da extremidade radicular com o preenchimento de extremidades radiculares do agregado de trióxido mineral (MTA) ou com guta-percha (GP) onde foram

analisados 52 dentes de 44 pacientes. Foram feitas radiografias que foram analisadas de modo randomizado e a cura foi avaliada como completa, incompleta, incerta ou insatisfatória. Seis dentes não estavam disponíveis para o controle de 12 meses: três dentes (GP) foram reoperados por causa da dor e dois dentes (um GP, um MTA) foram extraídos devido à fratura da raiz (estes cinco dentes foram classificados como falhas). Um paciente (GP) não estava disponível para acompanhamento do caso. No grupo GP, sete dentes (28%) apresentaram cicatrização completa, seis dentes (24%) cicatrização incompleta, seis dentes (24%) cicatrização incerto e dois dentes (8%) cicatrização insatisfatória após 1 ano. No grupo MTA, 22 dentes (85%) apresentaram cicatrização completa, três dentes (12%) cicatrização incompleta e nenhum foi classificado como incerto ou insatisfatório após 1 ano. A diferença na cicatrização entre os grupos GP e MTA foi significativa ($P < 0,001$). Os dentes tratados com MTA tiveram cicatrização significativamente melhor (96%) do que os dentes tratados com GP apenas (52%).

Ashraf et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de dois materiais obturadores (GuttaFlow e guta-percha convencional) em fibroblastos de ratos através de teste de dimethylthiazol diphenyltetrazolio bromida após 1 h, 24 h e 72 h. Os resultados mostraram uma menor toxicidade da GuttaFlow nas amostras de 24 h e 72 h mas sem diferença significativa após 1 h. Portanto, a toxicidade da guta-percha aumentou com o passar do tempo.

Borlina et al. (2010) avaliaram a influência da ampliação do forame apical na cicatrização de lesões periapicais crônicas em dentes de cães após a obturação do canal radicular com Sealer 26 ou Endometasona e, após os testes observaram que o alargamento do forame apical e o cimento contendo hidróxido de cálcio (Sealer 26) foram mais favoráveis à cicatrização de lesões periapicais crônicas.

Eid et al. (2013) avaliaram os efeitos dos cones CPoint na viabilidade e no potencial de mineralização de células odontoblasto-like através de ensaio de MTT, da expressão do marcador de genes osteogênicos com q-PCR, atividade de fosfatase alcalina, ensaio de alizarina e microscopia eletrônica. Observaram uma maior citotoxicidade inicial dos cones de CPoint em relação

a guta-percha em extratos mais concentrados (1:1) porém não foi observada em diluições de 1:10 e 1:100. Concluíram, portanto, que a biocompatibilidade do CPoint é comparável à guta-percha com mínimos efeitos adversos na osteogênese após a diluição de potenciais componentes tóxicos.

Belladonna et al. (2014) avaliaram a biocompatibilidade da guta-percha auto-adesiva em relação a guta-percha convencional através da inserção subcutânea dos materiais em dorso de ratos. As amostras foram colhidas e analisadas após 7, 21 e 63 dias. A conclusão foi que a guta-percha modificada foi mais biocompatível do que a convencional.

Cheng et al., em 2014 conduziram um estudo investigar a influência do aquecimento sobre a propriedade física e a biocompatibilidade de guta-perchas nas formas α - e β . As guta-perchas α e β foram submetidas a dois processos de aquecimento. O aumento dos ciclos de aquecimento para a guta-percha α e β não exerce influência adversa sobre sua biocompatibilidade porque a propriedade física da guta-percha forma β torna-se instável quando é aquecida a mais de 300°C podendo não ser recomendada para uso em técnicas de obturação termoplastificada.

Ainda em 2014, Mandal et al. avaliaram os efeitos citotóxicos de GuttaFlow 2 (Coltène Whaledent, GmBH + Co KG, Langenau, Suíça) que é um material a base de guta-percha sobre fibroblastos gengivais humanos. Dentre os experimentos observaram que os extratos puros deste material não se apresentaram citotóxicos tanto em extratos encubados por 24 h quanto por 72 h.

Em 2016, Carvalho et al. analisaram o efeito de guta-perchas comercial e experimental com adição de vidro de fosfato de níbio na formação de biofilme pelas bactérias da placa bacteriana humana através de ensaios de viabilidade. Também analisaram o pH e a liberação regular de material. Observaram uma redução na formação de biofilme na guta-percha modificada com material biocerâmico e na guta-percha modificada com vidro de fosfato de níbio. Esta última também apresentou a menos quantidade de bactérias viáveis em biofilme com alto pH.

2.2 Outros Materiais para Confecção de Cones de Obturação

Em 1993, Wiese já questionava a possibilidade de uso de um material com expansão osmótica e mostrou que o copolímero de metilmetacrilato vinilpirolidona testado em ratos se mostrou um sistema efetivo e biocompatível.

Novamente Wiese et al. (2001) investigaram as propriedades de expansão e a biocompatibilidade de um novo material expensor de tecido. O material auto-inflável é um hidrogel consistindo de um copolímero modificado de metilmetacrilato e N-vinil-2-pirrolidona, que absorve água por osmose. Para aumentar o volume de inchamento, o material de gel primariamente neutro foi modificado convertendo-o num gel ionizado. Para estudar o comportamento de inchaço e pressão do material, cilindros de gel anidro foram equilibrados em soluções de água destilada, solução salina e açúcar. A biocompatibilidade foi investigada em cultura celular. A partir destes resultados, concluiu-se que existe uma elevada biocompatibilidade deste material expensor, que pode ser um candidato favorável e interessante para outras aplicações clínicas.

Jitaru et al. (2016) estudaram os materiais biocerâmicos em endodontia através de uma revisão de literatura nos últimos 10 anos e observaram muitos estudos relacionados ao tema. Geralmente, os estudos são a favor do uso desses materiais, porém não há no mercado muitos produtos para uso endodôntico. Eles sugerem mais pesquisas conforme novos produtos forem lançados para dados mais confiáveis. Apesar desse trabalho analisar materiais e seladores endodônticos, as mesmas propriedades podem ser aplicadas aos cones obturadores.

2.3 COL1

Em 2003, Camp et al. avaliaram a ligação de *explants* de fibroblastos de ligamento periodontal humano e fibroblastos gengivais a 4 diferentes materiais de retrobturação endodôntica: Amalgama Tytin Fast-Set (Kerr, Orange, CA), SuperEBA (Bosworth, Skokie, IL), ProRoot (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) e Geristore (Den-Mat, Santa Maria, CA). Embora o ligamento periodontal e os fibroblastos gengivais inicialmente ligaram-se avidamente ao Geristore, essas mesmas células não apresentassem ligação significativa com o ProRoot, o amálgama Tytin ou o SuperEBA. Com maior tempo de incubação com Geristore, a ligação do ligamento periodontal e dos fibroblastos gengivais melhorou e estas células proliferaram. Em contraste, não foi observada qualquer melhoria na ligação ou proliferação para células incubadas durante mais tempo com ProRoot, amálgama Tytin ou SuperEBA. Como as características de ligação desses dois grupos de fibroblastos eram idênticas, foi examinado o papel da família de receptores (integrinas) da matriz extracelular sobre a fixação de fibroblastos gengivais. A ligação dos fibroblastos gengivais ao colágeno tipo I foi determinada como sendo dependente das integrinas alfa1beta1 e alfa2beta1. Contudo, a ligação de fibroblastos gengivais a Geristore não foi reduzida pela adição de qualquer dos anticorpos anti-integrina que perturbam a ligação examinados. Assim, os fibroblastos gengivais ligam-se a Geristore, mas esta ligação foi mediado por mecanismos diferentes das integrinas.

Fayazi et al. (2011) avaliaram a reação de fibroblastos de ligamento periodontal humano aos materiais retrobturadores de extremidades radiculares, tais como ProRoot MTA, cimento Portland e amálgama na expressão de Fibronectina, Colágeno 1 (Col1) e fator de crescimento TGF, através de cultura de fibroblastos de 8 dentes e da posterior exposição dessas células aos extratos dos materiais supracitados. A expressão de colágeno nas células expostas ao extrato de MTA foi significativamente maior do que os outros grupos em 24 h. Após 48 h, o grupo de cimento Portland mostrou a maior expressão de colágeno e após 1 semana, o cimento Portland e os grupos MTA tiveram a maior expressão de colágeno, mas não houve diferença significativa entre estes dois

grupos. Após 1 semana, o grupo de cimento Portland demonstrou uma quantidade mais elevada de TGF e fibronectina.

2.4 CEMP1

Carmona-Rodríguez et al. (2007) demonstraram, pela primeira vez, que o CEMP1 pode promover diferenciação de osteoblástica e/ou cementoblástica dos fibroblastos humanos. Também demonstraram que o CEMP1 também pode promover proliferação e diferenciação do fibroblasto humano em célula “mineralizing-like” e sua expressão tem a habilidade de formar nódulos mineralizados e deposição de cálcio em células não-osteogênicas. Portanto, sugerem que CEMP1 pode ter uma potencial função na formação de cimento e osso.

Villarreal-Ramírez et al. (2009) produziram uma proteína CEMP1 recombinante e a testaram em uma linhagem de células de fibroblastos de gengiva humana. Verificou-se que CEMP1 é N-glicosilado, fosforilado e possui uma forte afinidade para hidroxiapatita. Ainda mais importante, os resultados mostram que a CEMP1 desempenha um papel durante o processo de biomineralização promovendo a nucleação de cristais de fosfato octacálcico (OCP). Estas características tornam CEMP1 um candidato muito bom para aplicações biotecnológicas, a fim de alcançar cimento e/ou regeneração óssea.

Hoz et al. (2012) mostraram através de experimentos de RT-PCR que CEMP1 promoveu proliferação celular nas células de ligamento periodontal humano em culturas 3D e induziu a formação de um tecido parecido ao tecido ósseo e/ou cementário e um tecido similar a cartilagem.

Bermúdez et al. (2015) investigaram as consequências de sua expressão do CEMP1 em fibroblastos gengivais humanos crescendo em meios não-mineralizantes através da comparação de perfis de expressão gênica. Identificaram vários mRNAs cuja expressão é modificada pela indução de CEMP1 em células de ligamento periodontal. A análise de enriquecimento mostrou que vários destes genes expressos estão envolvidos na oncogênese.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação de Fibroblastos de Ligamento Periodontal.

Objetivos específicos

- Avaliar a resposta *in vitro* de fibroblastos do ligamento periodontal humano ao Cone de Guta-Percha Biocerâmico e Cone CPoint em comparação a Cones de Guta-Percha Convencional em relação à viabilidade celular.
- Avaliar a resposta *in vitro* de fibroblastos do ligamento periodontal humano ao Cone de Guta-Percha Biocerâmico e Cone CPoint em comparação a Cones de Guta-Percha Convencional em relação à expressão gênica de colágeno I e proteína cementária 1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de fibroblastos de ligamento periodontal humano

O projeto foi iniciado após aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo com o parecer de nº 1.774.956 (Anexo A). Um terceiro molar hígido com rizogênese completa foi obtido por meio de doação voluntária por paciente (n=1) da clínica de Cirurgia da FOU SP. O ligamento periodontal foi removido com o auxílio de curetas e imerso em meio de cultura. Após fragmentação, o tecido foi mantido em frascos para cultura contendo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), 100U/mL de penicilina (Invitrogen), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As células foram obtidas por meio de técnica de *explant*. Após atingirem 90% de confluência, células foram subcultivadas empregando solução de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,05% (Invitrogen) (Sipert et al., 2013). Os fibroblastos foram empregados a partir da 4ª passagem. Após o término do trabalho, as células estocadas foram descartadas em lixo infectocontagioso.

Preparo do extrato de cones de obturação

Para fins de padronização, foram empregados cones com diâmetro apical #35 e conicidade 0,06 cortados em 20 mm. Cada cone foi inserido em 1 mL de DMEM 10% SBF e mantido a 37°C por 7 dias. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em filtrado em membranas de 0,22 µm e estocados a -20°C até o uso. Previamente ao uso como estímulo, os extratos foram submetidos a diluição seriada de 1/5.

Estimulação dos fibroblastos de ligamento periodontal com extrato de cones de obturação

Células foram semeadas na quantidade de $1,25 \times 10^4$ ou 5×10^4 células/poço em placas de 96 ou 24 poços respectivamente e mantidas por 24 h para aderirem. O meio então foi trocado por DMEM 10% puro ou pelos extratos. As análises foram feitas após 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Viabilidade celular por MTT

A citotoxicidade dos extratos de guta-percha aos fibroblastos foi avaliada por meio do ensaio com (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazólio Brometo) (MTT) (Molecular Probes, Waltham, MA, EUA). Após o tempo experimental descrito, 20µL de solução de MTT foram adicionados aos poços seguidos de 180µL de DMEM 10% a cada poço. Os fibroblastos foram incubados a 37°C por 4 h protegidos da luz. O MTT foi então descartado e 100 µL de álcool isopropílico foi colocado em cada poço. A placa foi incubada em mesa agitadora durante 30 min para dissolver os cristais de formazan. O valor da densidade óptica foi medido por espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) a 570nm. O metabolismo celular é diretamente proporcional à quantidade de formazan formado e os dados dos grupos experimentais foram comparados ao grupo controle (células + meio).

Deteção da expressão gênica de colágeno 1 e CEMP-1 por qPCR

Uma vez determinadas as condições experimentais que não comprometeram a viabilidade celular por 72 h, o ensaio conduzido em placas de 24 poços foi utilizado para recuperação das células em Trizol® (Invitrogen, Thermofisher) para extração de RNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa.

Extração de RNA total: Para a extração de RNA total foi utilizado o método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio conforme descrito na literatura e reproduzido anteriormente. O RNA foi extraído em Trizol, isolado por clorofórmio, precipitado por álcool isopropílico e lavado em álcool 75% em água com dietil

pirocarbonato (DEPC) a 0,1%. Após secagem, a ressuspensão do RNA total foi realizada com 15 µL de água DEPC a 0,1% e armazenadas a -80°C.

Quantificação do RNA total: A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm (Nanodrop® - Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

Transcrição reversa: A transcrição reversa das amostras de RNA em DNA complementar (cDNA) foi realizada por meio do kit comercial Superscript II (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA juntamente com a enzima transcriptase reversa, tampão e primer.

PCR quantitativo: A expressão quantitativa dos genes para colágeno tipo I e proteína cementária-1 (CEMP-1) foi analisada por meio de reações de PCR quantitativa, utilizando-se o sistema Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho Fast 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Para esta reação, foram utilizados conjuntos de primers (todos da Life Technologies) para COL1A1 (Hs00164004_m1) e CEMP-1 (Hs04185363_s1) tendo como controle endógeno o gene GAPDH (Hs02758991_g1) seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram analisados com base no valor de C_T (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de C_t de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação a um controle interno (GAPDH), e então comparados com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas, obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados de viabilidade celular foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio de análise de variância a um critério (ANOVA) seguida de teste de Tukey para as comparações entre as diluições, materiais e controle. Foi adotado nível de significância de 5% para a verificação das possíveis diferenças entre os grupos.

5 RESULTADOS

Os resultados abaixo foram subdivididos quanto a viabilidade celular pelo ensaio do MTT e pela expressão gênica de COL1 e CEMP1.

5.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada no tempo experimental de 72 h. A figura 5.1 ilustra a viabilidade celular frente ao contato dos fibroblastos do ligamento periodontal com os extratos dos 3 cones analisados: guta-percha convencional (VDW), guta-percha modificada por material biocerâmico (BC) e cone de polímero (CP), em extratos do grupo controle (0), extrato puro (1:1), extrato em diluição 1:5 e extrato em diluição 1:25, respectivamente. A viabilidade celular foi significativamente reduzida em comparação com o controle (0) nos grupos guta-percha convencional e cone de polímero, ambos em extrato puro (1:1) sendo que este último também reduziu significativamente a viabilidade celular na diluição de 1:5. Os extratos puros destes dois materiais também foram significativamente citotóxicos em comparação com os cones BC (Figura 5.1).

5.2 Expressão gênica de colágeno I e proteína cementária 1

A expressão gênica de COL1 e CEMP-1 foi detectada por RT-qPCR e está representada na figura 5.2. A expressão constitutiva de COL1 (Figura 5.1A) (Meio) não foi alterada de forma significativa pelos extratos na diluição de 1:5. No entanto, o cone de guta-percha convencional (VDW) induziu significativa expressão de CEMP-1 em comparação com o controle (Meio) e com o extrato de cone BC (Figura 5.2B).

Figura 5.1 - Viabilidade celular após 72 horas nas concentrações 0 (controle), 1 (extrato puro), diluição 1:5 e diluição 1:25. Diferença significativa em comparação ao controle (*) e em comparação ao BC na mesma diluição (#)(n=3, **p<0,01; *** ou ### p<0,001)

Figura 5.2 - A expressão gênica de COL1 (Fig. 2A) e CEMP-1 (Fig. 2B). Diferença significativa em comparação com as barras indicadas (*) (n=3, p<0,05)

6 DISCUSSÃO

A Endodontia é a especialidade da Odontologia que tem como objetivo central prevenir e tratar as doenças do periápice que se desenvolvem em consequência à inflamação e infecção da cavidade pulpar (Lopes; Siqueira, 2015). Após a limpeza e sanificação dos canais radiculares, é essencial que a cavidade seja devidamente preenchida e selada, evitando assim sua (re)contaminação e possibilitando o reparo tecidual. Sendo assim, a obturação dos canais radiculares exerce papel fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico.

Em 1976, Grossman determinou as propriedades ideais do material obturador: selar o canal lateral e apicalmente; não ser tóxico ou irritante para o tecido periapical, ou seja, ser biocompatível; não sofrer contração após a presa; ser impermeável; ser bacteriostático; não manchar a estrutura do dente; ter um bom tempo de trabalho; ser solúvel em solventes comuns para permitir a desobturação e ser radiopaco. Dentre estas propriedades, a biocompatibilidade tem sido amplamente investigada pela literatura científica com base em materiais obturadores. Por meio de estudos *in vivo*, diversos trabalhos demonstraram diferenças importantes da resposta tecidual dependendo do material de escolha.

Com base em diversos estudos histológicos, a guta-percha é considerada como um material inerte. Entretanto, esse conceito tem sido questionado desde 1990 por Pascon e Spångberg. Os autores demonstram que, após testes com 17 tipos de cone de guta-percha, todos foram tóxicos em período de observação mais longo e essa toxicidade foi atribuída aos íons de zinco presentes nos extratos liberados pelos cones. Sendo assim, no presente estudo empregamos métodos de cultivo celular e biologia molecular para investigar o efeito da guta-percha sobre células do ligamento periodontal devido à maior sensibilidade destes métodos e foi observado que a guta-percha convencional da marca VDW apresentou citotoxicidade importante conforme ensaio de viabilidade realizado com o extrato puro. Esta toxicidade foi significativamente menor quando o extrato foi diluído cinco vezes. Estes dados corroboram os achados supracitados de Pascon e Spångberg (1990).

Witherspoon e Gutmann (2000) em seu estudo *in vivo* que mostraram que o cimento Diaket (3M ESPE) apresentou melhores propriedades de cura do ligamento periodontal do que a guta-percha. Já em estudo *in vitro*, Ahsraf et al. (2010) demonstraram que a toxicidade da guta-percha é maior com o aumento do tempo de exposição dos fibroblastos aos seus extratos. Por outro lado, estes dados contrastam com os resultados demonstrados por Balto e Al-Nazhan (2003) que avaliaram *in vitro* a adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal humano a materiais obturadores tais como amálgama, Super-EBA e guta-percha e seus resultados mostraram que, dentre estes, a guta-percha se apresentou como o melhor substrato para adesão celular.

A Endodontia, assim como a maioria das especialidades da Odontologia, vem sofrendo muitas evoluções numa velocidade surpreendente, que exige do profissional uma constante renovação de seus conhecimentos e de seu domínio técnico. Neste contexto, substâncias têm sido propostas como aditivos a materiais obturadores incluindo os cones para obturação. Já existem estudos, como o de Szep et al. (2003) no qual hidróxido de cálcio e clorexidina foram adicionados aos cones de obturação. O autor observou que os cones acrescidos de clorexidina se mostraram citotóxicos às células do ligamento periodontal, enquanto os de hidróxido de cálcio não mostraram diferença significativa em relação aos cones não modificados.

Mais recentemente, outros materiais que foram adicionados à guta-percha estão sendo estudados, tais como o vidro de fosfato de nióbio por Carvalho et al. (2016) sendo que foi observada a redução na formação do biofilme e menor quantidade de bactérias viáveis no mesmo e a hidroxiapatita por Sun et al. (2007) que observaram que este material biocerâmico pode promover a proliferação e diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal e ainda que possa ser utilizado como um agente biorreabsorvível em preenchimento ósseo.

Ainda no presente estudo, a adição de material biocerâmico conferiu menor citotoxicidade aos cones de guta-percha BC em comparação com os convencionais VDW. Estes materiais, como o MTA, são conhecidos por sua notável biocompatibilidade por meio de uma série de estudos. Osório et al. (1998) através de um modelo de cultura celular *in vitro* que mostrou a biocompatibilidade do MTA.

Gorduysus et al. (2007) compararam a citotoxicidade, a apoptose e/ou necrose induzidas e os mecanismos apoptóticos em fibroblastos do ligamento periodontal humano tratados com quatro materiais endodônticos diferentes: MTA Branco (White ProRoot MTA), Diaket, Endion e CYMED 8410 realizados através de ensaios de MTT. Seus resultados sugerem que o MTA é um material de obturação muito biocompatível. No entanto, Diaket, Endion e CYMED 8410 são tóxicos para fibroblastos *in vitro*.

Christiansen et al. (2009) compararam num estudo *in vivo* a cicatrização após a ressecção da extremidade radicular com o preenchimento das mesmas com MTA ou guta-percha e observaram que os dentes tratados com o MTA tiveram uma cicatrização significativamente melhor do que os dentes tratados com guta-percha após controles radiográficos pós-operatórios. Estes dados da literatura sugerem fortemente que materiais biocerâmicos apresentam propriedades de biocompatibilidade bastante favoráveis aos objetivos da obturação dos canais radiculares. De fato, no presente estudo, os cones biocerâmicos (BC) não apresentaram qualquer indício de toxicidade às células de ligamento periodontal mesmo quando empregado o extrato puro (Figura 5.1).

Ao longo das últimas décadas, tem sido proposto o uso de cones de obturação confeccionados com materiais resinosos em substituição à guta-percha, tais como Resilon e o RealSeal. Com a proposta de formar uma estrutura em monobloco no interior dos canais, estes cones são oferecidos comercialmente em conjunto com cimentos resinosos com capacidade de formação de um bloco de adesão às paredes do canal (Scotti et al., 2008).

A resposta tecidual a estes materiais foi demonstrada por Key et al. (2006) que avaliaram a citotoxicidade dos materiais de obturação do canal radicular Resilon e Epiphany versus guta-percha e os resultados obtidos foram que Resilon era semelhante à guta-percha e ao controle e todos se mostraram biocompatíveis aos fibroblastos. Donadio et al. (2008) avaliaram a citotoxicidade de cones de guta-percha, Active GP e Resilon em cultura celular *in vitro* e concluíram que o cone Resilon apresentou melhor biocompatibilidade do que os cones de guta-percha convencionais e cones GP Active. Scotti et al. (2008) avaliaram por meio de um teste indireto de citotoxicidade o sistema de obturação RealSeal comparado à guta-percha

e observaram maior viabilidade do RealSeal em comparação com a guta-percha. Whitterspoon e Gutmann (2000) demonstraram *in vivo* a resposta de cicatrização da guta-percha e do Diaket (3M ESPE) quando utilizados como material retrobturador em cirurgia perirradicular onde concluiu-se que o Diaket apresentou melhores propriedades de cura do que a guta-percha nas categorias deposição óssea e formação de ligamento periodontal. Economides et al. (2008) observaram em seu estudo histológico que os cones Resilon foram mais biocompatíveis do que os cones de guta-percha após a exposição das células de fibroblastos aos seus extratos. Considerando a natureza resinosa dos cones CPoint, estes dados da literatura contrastam com aqueles demonstrados pelo presente estudo uma vez que este cone se mostrou ligeiramente mais citotóxico que a guta-percha (Figura 5.1). Vale ressaltar, no entanto, que se trata de composição distinta dos materiais supracitados.

Materiais à base de polímero que sofrem expansão na presença de umidade estão sendo estudados para o uso na obturação do canal radicular. Wiese (1993) mencionou a possibilidade de uso de um material com expansão osmótica e mostrou que o copolímero de metilmetacrilato vinilpirrolidona, quando testado em tecido subcutâneo de dorsos de ratos, se mostrou biocompatível. Novamente Wiese et al. (2001) estudaram as propriedades de expansão e a biocompatibilidade de um hidrogel consistindo de um copolímero modificado de metilmetacrilato e N-vinil-2-pirrolidona, que absorve água por osmose e também concluiu que existe uma elevada biocompatibilidade deste material expansor. Eid et al. (2013) avaliaram os efeitos dos cones CPoint na viabilidade e no potencial de mineralização de células odontoblasto-like e concluíram que a biocompatibilidade do CPoint é comparável à da guta-percha. No presente estudo, os cones CPoint demonstraram citotoxicidade ligeiramente superior à da guta-percha convencional. Ambos materiais foram significativamente tóxicos às células de ligamento periodontal quando avaliados os extratos puros e o CPoint também na diluição de 1:5 (Figura 5.1) em comparação com o controle.

Para avaliar o potencial efeito deletério ou benéfico de materiais, não apenas a viabilidade constitui de parâmetro importante. A capacidade de modulação da função celular também constitui objetivo relevante em pesquisas científicas. Neste estudo, foi investigada a expressão gênica de colágeno I e de proteína cementária -1

por células em contato com eluentes de cones de obturação. Com base em nossos achados, observamos que a expressão constitutiva de COL1 não foi alterada de forma significativa pelos extratos. No entanto, o cone de guta-percha convencional induziu significativa expressão de CEMP-1 em comparação com o controle e com o extrato de cone modificado por material biocerâmico.

Em contraste com os resultados do presente estudo, Fayazi et al. (2011) relataram aumento de genes para COL1 por materiais biocerâmicos por meio de exposição de fibroblastos de ligamento periodontal humano aos extratos de ProRoot MTA e cimento de Portland. Podemos especular que a difusão de componentes indutores de reparo por cones biocerâmicos possa obedecer um padrão distinto daquele observado por materiais seladores devido às suas propriedades físicas. Dentro do processo de reparo, o colágeno é essencial para a formação da matriz extracelular que serve de substrato para adesão celular e confere estabilidade ao tecido conjuntivo neoformado. Cabe salientar que excesso de produção de colágeno pode significar indução à fibrose tecidual (Fries et al., 1994) sendo que este fenômeno também não foi observado por meio deste estudo. Por outro lado, a presença de substâncias liberadas pelos cones testados não reduziu a expressão gênica constitutiva de colágeno I, o que nos permite sugerir que estes materiais não seriam capazes de interferir negativamente na produção desta importante proteína durante o processo de reparo.

No contexto de regeneração tecidual, a produção de cimento é essencial para formação do tecido de substituição. Alguns autores denominam esta produção de selamento biológico considerando este cenário como a condição de reparo ideal para o tratamento endodôntico (Leonardo, 2005). Sendo assim, a indução de deposição de cimento por material obturador pode ser considerado um parâmetro favorável. Tanto Carmona-Rodríguez et al. (2007) e Villarreal-Ramírez et al. (2009) quanto Hoz et al. (2012) mostraram em seus experimentos que a expressão do gene CEMP-1 está relacionada à formação de tecido ósseo e de tecido cementário. Em nosso estudo, a guta-percha convencional foi capaz de aumentar a expressão gênica de CEMP-1, porém os demais materiais não modificaram este parâmetro. Esta produção foi inclusive significativamente superior àquela observada para o cone biocerâmico, apesar dos estudos que demonstram o potencial de reparo que apresentam materiais desta natureza (Witherspoon; Gutmann, 2000; Gorduysus et

al., 2007; Sun et al., 2007; Christiansen et al., 2009). Não menos importante, a ausência de inibição por qualquer um dos materiais testados também constitui de observação relevante, uma vez que o material obturador não deve atrapalhar ou atrasar o reparo natural do tecido periodontal (Grossman, 1976).

Alguns pesquisadores focam em mecanismos biológicos como fatores únicos de sucesso clínico em Endodontia. O entendimento dos fenômenos biológicos pelo clínico é de vital importância para definir diagnósticos, tratar e curar as alterações endodônticas, porém o desprezo e a falta de domínio na execução das técnicas aplicadas na Endodontia, obviamente não irão coroar seu resultado clínico com êxito.

Portanto, o Endodontista deve dominar a técnica e a biologia para oferecer resultados clínicos concretos e a cura das alterações periapicais por regeneração ou reparação.

Os materiais obturadores hoje empregados vêm se adaptando às novas tendências anteriormente mencionadas e estes materiais estão se adequando às principais necessidades observadas em pesquisas.

Diante de todo assunto pesquisado e dos experimentos realizados, conclui-se que a inércia da guta-percha é um conceito definitivamente questionável: além de se apresentar citotóxica, ela induziu a expressão de proteína cementária 1. Sua substituição por novos materiais é uma realidade promissora uma vez que cones biocerâmicos se mostraram mais biocompatíveis enquanto o cone de polímero apresentou biocompatibilidade ligeiramente inferior. O presente estudo demonstra a importância do conhecimento acerca de materiais obturadores sólidos pois, apesar da execução adequada de técnicas de obturação, o estudo dos materiais obturadores e de seus efeitos sobre os tecidos periapicais são de fundamental importância para a escolha do material adequado para a obturação dos canais radiculares.

7 CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- Nas situações experimentais *in vitro* relacionadas à viabilidade celular, os extratos dos cones de guta-percha convencional e do cone CPoint se mostraram citotóxicos às células do ligamento periodontal humano numa condição concentração-dependente. Já o cone modificado por material biocerâmico se mostrou biocompatível em todas as concentrações testadas.
- O cone de guta-percha convencional foi o único capaz de aumentar a expressão gênica de proteína cementária-1, enquanto nenhum dos materiais testados alterou a expressão de colágeno 1.

REFERÊNCIAS¹

Ahsraf H, Taherian A, Kerdar AN. Evaluation of cytotoxicity of two root canal filling materials by MTT assay. *Aust Endod J*. 2010 Apr;36(1):24-8.

Balto H, AL-Nazhan S. Attachment of human periodontal ligament fibroblasts to 3 different root-end filling materials: scanning electric microscope observation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Feb;95(2):222-7.

Belladonna FG, Calasans-Maia MD, Novellino Alves AT, de Brito Resende RF, Souza EM, Silva EJ, et al. Biocompatibility of a self-adhesive gutta-percha-based material in subcutaneous tissue of mice. *J Endod*. 2014 Nov;40(1):1869-73.

Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 induces transformation in human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2015 May;10(5):e0127286.

Borlina SC, de Souza V, Holland R, Murata SS, Gomes-Filho JE, Dezan Junior E, et al. Influence of apical foramen widening and sealer on the healing of chronic periapical lesions induced in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Jun;109(6):932-40.

Breault LG, Schuster GS, Billman MA, Hanson BS 3rd, Kudryk VL, Pashley DH, et al. The effects of intracanal medicaments, fillers, and sealers on the attachment of human gingival fibroblasts to an exposed dentin surface free of a smear layer. *J Periodontol*. 1995 Jul;66(7):545-51.

Bunn CW. Molecular Structure and Rubber-Like Elasticity. I. The Crystal Structures of beta Gutta-Percha, Rubber and Polychloroprene. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*. 1942 March;180(980):40-66.

Camp MA, Jeansonne BG, Lallier TE. Adhesion of human fibroblasts to root-end filling materials. *J Endod*. 2003 Sep;29(2):602-7.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul;358(3):763-9.

Carvalho CN, Wang Z, Shen Y, Gavini G, Martinelli JR, Manso A, et al. Comparative analyses of ion release, pH and multispecies biofilm formation between conventional and bioactive gutta-percha. *Int Endod J*. 2016 Nov;49(11):1048-56.

Cheng YA, Huang SH, Hsien HC, Chiang YC, Lin CP. Influence of cyclic heating on physical property and biocompatibility of α - and β -form gutta-percha. *J Formos Med Assoc*. 2014 Aug;113(8):498-505.

Christiansen R, Kirkevang LL, Hørsted-Bindslev P, Wenzel A. Randomized clinical trial of root-end resection followed by root-end filling with mineral trioxide aggregate or smoothing of the orthograde gutta-percha root filling--1-year follow-up. *Int Endod J*. 2009 Feb;42(2):105-14.

Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da polpa*. 10a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

Donadio M, Jiang J, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon cones in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Jul;106(1):e76-9.

Eastman A, Rigas JR. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol*. 1999 Oct;26(5 Suppl 16):7-16; discussion 41-2. Review.

Economides N, Koulaouzidou EA, Gogos C, Kolokouris I, Beltes P, Antoniadis D. Comparative study of the cytotoxic effect of Resilon against two cell lines. *Braz Dent J*. 2008;19(4):291-5.

Eid AA, Nikonov SY, Looney SW, Didato A, Niu LN, Levin MD, et al. In Vitro biocompatibility evaluation of a root canal filling material that expands on water sorption. *J Endod*. 2013 Jul;39(7):883-8.

Fayazi S, Ostad SN, Razmi H. Effect of ProRoot MTA, Portland cement, and amalgam on the expression of fibronectin, collagen I, and TGF β by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Indian J Dent Res*. 2011 Mar-Apr;22(2):190-4.

Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Sep;72(3):283-92.

Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am*. 1992 Apr;36(2):357-78.

Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2007 Dec;33(12):1450-4.

Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J Endod*. 1976 Jun;2(6):166-75.

Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J*. 2005 Feb;38(2):137-43.

Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int*. 2012 Feb;36(2):129-36.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J*. 2002 Feb;35(2):153-8.

Jitaru S, Hodisan I, Timis L, Lucian A, Bud M. The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med*. 2016;89(4):470-3.

Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2000 May;26(5):288-91.

Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts *J Endod*. 2006 Aug;32(8):756-8.

Kolokuris I, Beltes P, Economides N, Vlemmas I. Experimental study of the biocompatibility of a new glass-ionomer root canal sealer (Ketac-Endo). *J Endod*. 1996 Aug;22(8):395-8.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia: biologia e técnica. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; Campus; 2015.

Lowenberg B, Thibault J, Lawrence C, Sodek J. The influence of chemically-induced modifications of root surfaces on cell migration, attachment, and orientation. *J Dent Res*. 1986 Jul;65(7):1010-5.

Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod*. 2014 Aug;40(8):1156-9.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod*. 1998 Feb;24(2):91-6.

Pascon EA, Spångberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *J Endod*. 1990 Sep;16(9):429-33.

Prakash R, Gopikrishna V, Kandaswamy D. Gutta-Percha: an untold story. *Endodontology*. 2005 Dec;17(2):32-6.

Ranade MP, Kamra AI. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic materials. *Endodontology*. 2003;15:7-13.

Scotti R, Tiozzo R, Parisi C, Croce MA, Baldissara P. Biocompatibility of various root canal filling materials ex vivo. *Int Endod J*. 2008 Aug;41(8):651-7.

Seltzer S. Advances in biology of the human dental pulp. Newer restorative materials and the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971 Sep;32(3):454-60. Review.

Sipert CR, Morandini AC, Modena KC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. *J Appl Oral Sci*. 2013 Mar-Apr;21(2):99-105.

Sun W, Chu C, Wang J, Zhao H. Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 May;18(5):677-83.

Szep S, Grumann L, Ronge K, Schriever A, Schultze M, Heidemann D. In vitro cytotoxicity of medicated and nonmedicated gutta-percha points in cultures of gingival fibroblasts. *J Endod*. 2003 Jan;29(1):36-40.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod*. 1995a Nov;21(11):569-71.

Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod*. 1995b Mar;21(3):109-12.

Villarreal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarria I, et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jun 19;384(1):49-54.

Wiese KG. Osmotically induced tissue expansion with hydrogels: a new dimension in tissue expansion? A preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*. 1993 Oct;21(7):309-13.

Wiese KG, Heinemann DE, Ostermeier D, Peters JH. Biomaterial properties and biocompatibility in cell culture of a novel self-inflating hydrogel tissue expander. *J Biomed Mater Res*. 2001 Feb;54(2):179-88.

Witherspoon DE, Gutmann JL. Analysis of the healing response to gutta-percha and Diaket when used as root-end filling materials in periradicular surgery. *Int Endod J*. 2000 Jan;33(1):37-45

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: Estudo in vitro do efeito de cones de obturação endodôntica na biomodulação de Fibroblastos de Ligamento Periodontal

Pesquisador: Carla Renata Sipert

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60535616.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.774.956

Apresentação do Projeto:

A obturação do canal radicular é uma etapa fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico. É desejável que os materiais empregados nesta fase não interfiram negativamente com o reparo tecidual, mas preferencialmente estimulem a regeneração dos tecidos periapicais. Recentemente, cones de guta-percha combinados com material biocerâmico foram desenvolvidos com esta finalidade. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar o potencial citotóxico e biomodulador de cones de guta-percha contendo biocerâmica sobre células de ligamento periodontal in vitro. Cultura de fibroblastos de ligamento periodontal será estabelecida a partir de terceiro molar humano. As células serão estimuladas com extratos de cones de guta-percha convencional ou contendo biocerâmica em diluição seriada para teste de viabilidade celular por meio do método MTT por 24, 48 e 72 h. O sobrenadante das culturas será empregado para dosagem de óxido nítrico por meio do ensaio de Griess. Em seguida, a maior concentração que não comprometer a viabilidade será empregada para estimulação das células por 72 h para detecção da expressão gênica de colágeno tipo I e proteína cementária 1 por RT-qPCR. Os dados serão estatisticamente analisados por meio de ANOVA sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária		
UF: SP	Município: SÃO PAULO	
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 1.774.956

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar a resposta in vitro de fibroblastos do ligamento periodontal humano ao Cone de Guta-Percha Bioocerâmico e Cone CPoint em comparação a Cones de Guta-Percha Convencional em relação a atividade mitocondrial, produção de óxido nítrico e indução de diferenciação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: você não terá nenhum benefício direto, mas a doação do seu dente extraído poderá resultar na aquisição de conhecimento científico acerca de tratamentos odontológicos realizados em dentes que não se desenvolveram por completo.

RISCOS: envolvidos serão inerentes a qualquer procedimento cirúrgico, como hemorragia, fratura de maxila ou mandíbula ou edema; porém todas as medidas necessárias para a realização do procedimento serão devidamente tomadas, assim como uma avaliação prévia do seu estado de saúde. Em caso de danos oriundos da participação na pesquisa científica, você será devidamente ressarcido e indenizado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois busca aprimorar os materiais utilizados na obtenção dos canais radiculares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE - OK

Projeto - OK

Autorização da Clínica - OK

Autorização Instituição - OK

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 1.774.955

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_794459.pdf	29/09/2016 14:33:59		Aceito
Outros	Autorizacao_Clinica.pdf	29/09/2016 14:33:28	Carla Renata Sipert	Aceito
Folha de Rosto	Ass_Diretor.pdf	29/09/2016 14:33:03	Carla Renata Sipert	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ANogueira.pdf	15/09/2016 12:10:18	Carla Renata Sipert	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCE_ANogueira.docx	15/09/2016 12:02:26	Carla Renata Sipert	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Outubro de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Hays Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br