UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MILENA DA SILVA

**Produção de CXCL8 e Óxido Nítrico por neutrófilos
humanos estimulados com 4 cimentos endodônticos**

BAURU
2013

MILENA DA SILVA

**Produção de CXCL8 e Óxido Nítrico por neutrófilos
humanos estimulados com 4 cimentos endodônticos**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr Clovis Monteiro Bramante

Versão Corrigida

BAURU
2013

Si38p Silva, Milena da
Produção de CXCL8 e óxido nítrico por
neutrófilos humanos estimulados com 4 cimentos
endodônticos / Milena da Silva – Bauru, 2011.

141 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 059/2011
Data: 05/09/2011

DADOS CURRICULARES

MILENA DA SILVA

Nascimento	09 de março de 1986
Naturalidade	Santa Bárbara d'Oeste
Filiação	Marcos Antonio da Silva Zuleica Maria Zilda Mathias da Silva
2007 - 2010	Curso de Graduação em Odontologia- Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – FOB/USP.
2008 – 2010	Bolsista de iniciação científica (FAPESP).
2011 – 2013	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de Concentração em Endodontia
2012 – atual	Curso de Especialização em Endodontia – Hospital de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo – HRAC/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Primeiramente agradeço pelo presente da vida. Obrigada por me abençoar com a família que me destes, pela saúde, pelas oportunidades colocadas em meu caminho e por proporcionar que eu continuasse os meus estudos.

Aos meus Pais, Marcos Antonio da Silva e Zuleica M. Z. Mathias da Silva,

Dedico essa dissertação a vocês, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, nas horas tristes e felizes, sempre me apoiando nas minhas decisões, dando conselhos, me orientando, para que eu pudesse seguir em frente para alcançar os meus sonhos, objetivos.

Obrigada pelo amor, carinho, pela amizade, educação, confiança e por proporcionar o meu crescimento profissional. Hoje, se cheguei até aqui, foi porque vocês acreditaram em mim, me deram força nessa batalha.

Hoje quero parar e agradecer por ter vocês como os meus pais!

Vocês fizeram, fazem e farão sempre parte de minha história! Obrigada pela vida, por tudo!

A minha irmã Marina da Silva,

Má, obrigada pelo apoio, por me dar forças, me incentivar nessa caminhada e por torcer pela minha realização pessoal e profissional.

Saiba que você é uma das pessoas em que me inspiro, pela sua força de vontade, vontade de vencer e ser cada vez melhor. Te Amo!

Ao meu namorado Deon Liege Stefanovitz Hulett,

Amor, você entrou na minha vida em uma fase muito importante, bem na minha qualificação, e só me trouxe conforto, tranquilidade e confiança através das suas palavras sempre positivas. Agradeço pela companhia, pela amizade, pelo imenso amor e pela felicidade diária.

TE AMO!

Ao Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante,

Ao Mestre da Endodontia, que me acolheu como sua orientada, o meu muito Obrigada.

Agradeço a confiança depositada em mim, os ensinamentos passados, a dedicação com esse trabalho e com os casos clínicos que compartilhamos conjuntamente.

Tenho uma imensa admiração pelo senhor, pela sua pessoa e pelo professor que é, exigente, dedicado e apaixonado pela sua profissão!

A Profa. Dra. Ana Paula Campanelli,

Agradeço por ter me aceito no Departamento de Microbiologia, pois a realização desse projeto só foi possível porque você abriu as portas do laboratório para o desenvolvimento da minha pesquisa, além do seu tempo, que é bem concorrido e apertado, e mesmo assim se dispôs a me ajudar.

Obrigada pela sua orientação, ensinamentos passados.

Obrigada!

A Profa. Dra. Thaís Helena Gasparoto,

Só tenho a agradecer por tudo que fizestes por mim, pelos ensinamentos, pois foi você quem me ensinou tudo sobre cultura celular de neutrófilos, a base desse projeto, durante a minha iniciação científica. Se desenvolvi esse projeto foi por sua causa, a mentora disso tudo.

Aos meus familiares,

Obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram durante esses anos de pós-graduação.

Em especial aos meus tios, Agnaldo Feliciano e Isabel Cristina M. Feliciano, e ao meu primo-irmão Agnaldo Feliciano Junior. Vocês são a minha segunda família, meu outro porto seguro, que sempre estarão de braços abertos para me receber.

Agradeço o apoio e carinho!

As minhas amigas de faculdade, Camila Slompo, Nara Nichelini, Thamara F. Alberconi e Ana Flávia Soares.

Durante os quatro anos da faculdade que convivi com todas vocês, pude perceber o quão especial vocês eram. A graduação acabou, cada uma seguiu seu caminho, e apesar de quase todas permanecerem aqui em Bauru, nos distanciamos um pouco, mas a amizade permaneceu, assim como o carinho imenso que sinto por vocês.

Em especial, agradeço a Nara e a Thamara por doarem seu sangue, literalmente, para a realização dessa pesquisa.

À Patricia A. Oliveira, uma grande amiga e companheira durante esses anos em Bauru, desde a época da graduação, agradeço por tudo, pela amizade sincera, pela força e incentivo que me destes quando decidi fazer o mestrado, depois a especialização. São pessoas como você que fazem a distância de casa parecer um pouco menor.

Aos Profs. do departamento de Endodontia da FOB-USP, Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Norberti Bernardineli e a Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade,

Cada um, com seu jeito de ensinar, foram muito importantes para o meu crescimento profissional e pessoal. Esse convívio de mais de 2 anos foi muito prazeroso, pois além do relacionamento como aluna-professor, teve a amizade, a qual quero levá-la sempre comigo.

Aos meus companheiros e amigos de Mestrado, Carolina Filpo, Bruno Guimarães, Marcelo Vitoriano, Pablo Amoroso, Amanda Maliza, Marcela Arias e Marcela Milanezi, pela amizade, pelas horas passadas no departamento em ótimas companhias, pelos ensinamentos que cada um transmitiu, pelas risadas dadas juntas e momentos tensos, que foram amenizados por vocês. Esses anos aqui em Bauru foram vividos e compartilhados com cada um de vocês de uma maneira prazerosa. Obrigada por tudo, principalmente pela amizade. Sentirei saudades...e levarei comigo ótimas lembranças!!

Aos amigos do doutorado Raquel Medina, Marina Marciano, Aldo, Bruno Cavenarro, Paloma e Ronald O. Zapata, o meu muito obrigada. Cada momento que passamos juntos foi de grande valia. Agradeço a amizade e os ensinamentos. Lembrar-me-ei de cada um.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia FOB-USP, Suely Bettio, Andressa Tiossi e Edmauro de Andrade,

Obrigada por serem sempre prestativos, pela amizade.

Agradeço ao Narciso Almeida Vieira, enfermeiro responsável pela coleta de sangue periférico no laboratório de análises clínicas do HRAC-USP, que durante esses anos sempre estava aí disposto a acolher a mim e aos meus doadores. Obrigada pela prestatividade.

Ao departamento de Microbiologia,

Agradeço por todo apoio oferecido para a realização desse projeto, tanto pela infraestrutura, como pela relação profissional entre todos os funcionários e pós-graduandos. Em especial ao André Luis da Silva e Livia Maria de Melo, que proporcionaram os materiais necessários para minha pesquisa, e a Claudia P. Ramos e Carine E. de Oliveira, pela ajuda prática. E à secretária Dalva R. de Oliveira, sempre prestativa.

Aos meus Professores do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP, Celso Kenji Nishiyama e Lidiane de Castro Pinto, e à nossa auxiliar Edna Bramante.

Obrigada por terem me aceitado no curso de especialização mesmo eu estando com o mestrado em andamento, e por todos os ensinamentos passados, que contribuíram profundamente na minha vida profissional, e pelo incentivo para começar uma nova etapa da minha vida. Agradeço à Edninha pelos seus serviços prestados, deixando o setor organizando e fazendo com que o nosso dia-a-dia fosse proveitoso, além da amizade que foi cultivada a cada dia.

Aos meus colegas de residência em endodontia no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP, Márcia M. Santos, Sávio Brandelero, Daniela Cusicanqui, Yahir Munhoz, Thaís C. Pereira, Caio Aguiar, Patrícia Domenico, Marcelo de M. Vitoriano e Bruno M. Guimarães.

Obrigada pela convivência agradável no nosso setor apertadinho, pela amizade e compreensão. O primeiro ano de residência foi bem difícil, puxado, e com a ajuda de vocês consegui conciliar o mestrado com a residência, pois cada um ajudou da sua maneira. Levarei na memória esses anos com muita alegria de ter tido vocês como companheiros e amigos! Um agradecimento especial à Thaís, Patrícia, Marcelo, Bruno e Sávio...por doarem seus sangues, literalmente, para essa pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca e, em especial, aos do setor de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Leila Sanches, Margareth Mokarzel, Ana Letícia Momesso e Fátima Carvalho, os meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

AS INSTITUIÇÕES,

Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, na pessoa do diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira.

Por ter me aceito como membro dessa casa e proporcionado toda a infra-estrutura necessária para o desenrolar desse projeto.

À Comissão de Pós-graduação na pessoa do Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Hospital de reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP.

Agradeço por disponibilizar o seu laboratório de análises clínicas e os seus funcionários para a coleta de sangue.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fapesp,

Obrigada por todo apoio financeiro que me destes, proporcionando, dessa maneira, a realização e o bom desempenho desse projeto.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, que me proporcionou uma maior vivência didática, e a bolsa PAE.

*Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos
para o sucesso.*

*Se estamos possuídos por uma inabalável determinação,
Conseguiremos superá-los.*

*Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre
humíldes, recatados e despidos de orgulho.*

(Dalai Lama)

RESUMO

Um material obturador deve apresentar boas propriedades biológicas e físico-químicas, uma vez que ficará em íntimo contato com os tecidos periapicais. Sendo assim, não deve ser irritante aos tecidos adjacentes, possibilitando, ou mesmo favorecendo, o reparo da região periapical, para isso não devem alterar o processo inflamatório. O presente estudo avaliou a citotoxicidade dos cimentos AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e Sealepox em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos cultivados na presença ou ausência de LPS foram tratados com os cimentos em diferentes diluições (1:1, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) e tempo de presa (24 e 48 horas) durante 24 horas. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo, a dosagem de CXCL8 pelo método de ELISA, e Óxido Nítrico na absorvância de 540nm. Os dados foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism5 por ANOVA a 1 critério seguido pelo teste de Tukey, e os valores considerados significantes quando $p < 0,05$. O cimento AH Plus interferiu apenas na síntese de NO, estimulando-a, tendo a diluição 1:16 melhor comportamento biológico, em ambos períodos experimentais. O Sealapex diminuiu a produção de NO, sendo significativa para 1:32 em 48 horas. O MTA Fillapex induziu apoptose, a produção de CXCL8 (1:4 e 1:8 em 48 horas) e diminuiu a síntese de NO (1:32 em 48 horas). Sealepox diminuiu a apoptose (1:16 e 1:32 em 24 horas) e interferiu na produção de CXCL8, diminuindo-a (1:8 em 48 horas, e 1:16 em ambos os períodos). A citotoxicidade em ordem crescente dos cimentos foram: AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e Sealepox. Nosso estudo concluiu que os cimentos AH Plus e Sealapex foram os menos citotóxicos, que menos interferiram na viabilidade celular e na sua função (não indução de CXCL8 e na produção de NO), tanto em 24 horas como em 48 horas. MTA Fillapex e o Sealepox, apesar de causarem mais morte celular e interferirem na produção de NO e CXCL8, seus efeitos podem ser aceitáveis, uma vez que os níveis dessas alterações são, de tal maneira discretos, não agressivos.

Palavras-Chave: CXCL8. Neutrófilos. Cimentos obturadores. Citotoxicidade

ABSTRACT

Production of CXCL8 and Nitric Oxide by human neutrophils stimulated with 4 root canal sealers.

A filling material must have good biological and physicochemical, since you'll be in close contact with the periapical tissues. Thus it should not be irritating to the surrounding tissues, allowing, or even encouraging, the repair of the periapical region, for it must not alter the inflammatory process. The present study evaluated the cytotoxicity of AH Plus, Sealapex, MTA and Fillapex Sealepox in human neutrophils. Human neutrophils cultured in the presence or absence of LPS cements were treated with different dilutions (1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) and setting time (24 and 48 hours) for 24 hours. Cell viability was analyzed by flow cytometry, the dosage of CXCL8 by ELISA and nitric oxide in absorbance at 540 nm. Data were analyzed with the aid of GraphPad Prism5 ANOVA for the first criterion followed by Tukey test, and values considered significant when $p < 0.05$. The AH Plus sealer interfered only in NO synthesis, stimulating it, having a 1:16 dilution better biological behavior, in both experimental periods. The Sealapex decreased production of NO, with 1:32 significant to within 48 hours. The MTA Fillapex induced apoptosis, production of CXCL8 (1:4 to 1:8 within 48 hours) and reduced NO synthesis (1:32 in 48 hours). Sealepox decreased apoptosis (1:16 and 1:32 in 24 hours) and interfere with the production of CXCL8, reducing it (1:8 in 48 hours, and 1:16 in both periods). The cytotoxicity of the cements in ascending order were: AH Plus, Sealapex, MTA and Fillapex Sealepox. We conclude that AH Plus and Sealapex cements were less cytotoxic than less interfered with cell viability and function (CXCL8 and non-induced NO production) both in 24 hours and in 48 hours. MTA and Fillapex Sealepox, although most causing cell death and interferes the production of NO and CXCL8, their effects may be acceptable, since the levels of these changes are so mild, non-aggressive.

Keywords: CXCL8. Neutrophils. Root canal obturation. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Estrutura molecular da quimiocina CXCL8.....	37
Figura 2	- Cimentos Endodônticos	74
Figura 3	- Manipulação dos cimentos endodônticos.....	75
Figura 4	- Solução dos Cimentos diluídos em RPMI 10% SBF nas diluições de 1:1, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.....	76
Figura 5	- Análise da viabilidade celular	78

- GRÁFICOS

Gráfico 1	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS	84
Gráfico 2	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS	84
Gráfico 3	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS.....	86
Gráfico 4	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS.....	86
Gráfico 5	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS	88
Gráfico 6	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 48h na presença ou ausência de LPS	88
Gráfico 7	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 24h na presença ou ausência de LPS.....	90
Gráfico 8	- Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 48h na presença ou ausência de LPS.....	90
Gráfico 9	- Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS	92
Gráfico 10	- Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS	92
Gráfico 11	- Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS	94
Gráfico 12	- Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS	94

Gráfico 13 - Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS	96
Gráfico 14 - Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao MTA Fillapex 48h na presença ou ausência de LPS	96
Gráfico 15 - Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS	98
Gráfico 16 - Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS	98
Gráfico 17 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS	100
Gráfico 18 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS	100
Gráfico 19 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS	102
Gráfico 20 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS	102
Gráfico 21 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS	104
Gráfico 22 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao MTA Fillapex 48h na presença ou ausência de LPS	104
Gráfico 23 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS	106

Gráfico 24 - Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos ao Sealepox 48h na presença ou ausência de LPS	106
--	-----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Aa-LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Linfoma de células B 2)
BD	Biosciences
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
C	Cisteína
CA	Califórnia
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
C	Centímetro
CFU mL ⁻¹	Unidade formadora de colônia por mililitro
CGMNs	Células Gigantes Multinucleadas
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL-8	chemokine (C-X-C motif) ligand-8
D.C.	Depois de Cristo
DO	Densidade óptica
DMEM	Meio de eagle modificado por dulbecco
DNA	Desoxirribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
Ec-LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	NO Sintase endothelial
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
F	Fina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FPLH	Fibroblastos primários do ligamento periodontal humano
G	Gramma

GM-CSF	Granulocyte macrophage – colony stimulanting factor (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)
HCl	Ácido clorídrico
HEMA	Hidroxietil Metacrilato
HNP 1-3	Peptídeos de neutrófilos humanos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein (Proteína inibidora da apoptose)
IFN- α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina -1beta
iNOS	NO Sintase induzível
IP-10	Proteína Induzível-10
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
K	Kerr
Kb	Kilobyte
LL37	Catelicidina humana
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por microlitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MO	Missouri
mRNA	RNA mensageiro
MTA	Agregado Trióxido Mineral

MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng/mL	Nanograma por mililitros
ng	Nanograma
NED	N-naftil-etilenodiana
NK	Natural Killer
nm	Nanômetro
nmol	Nanomole
nNOS	NO Sintase Neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	NO Sintase
OR	Oregon
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solução salina tamponado por fosfato)
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia polimerase)
Pg-LPS	Lipopolissacarídeo de Porphyromonas gingivalis
pg/mL	Picograma por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PMNs	Neutrófilos polimorfonucleares
PR	Paraná
qRT-PCR	Real time quantitative - polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultura de células)
sCD23	Human soluble cluster of differentiation 23
sCD40L	Soluble Cluster of Differentiation 40 Ligand
SIL-6R	Soluble Interleukin-6 receptor
SP	São Paulo
SFB	Soro fetal bovino
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa

TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TLR4	Receptor Toll-Like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
X	Aminoácido não conhecido
XTT	Atividade mitocondrial
ZOEI	Óxido de zinco e eugenol com iodofórmio
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μmols	Micromols
μM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	Porcento
H	Horas
±	Mais ou menos
<	Menor
=	Igual
>	Maior
Xg	Vezes o valor da gravidade
+	Mais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	INFLAMAÇÃO	31
2.1.1	Neutrófilos e LPS.....	33
2.1.2	CXCL8.....	36
2.1.3	Óxido Nítrico.....	39
2.1.4	Viabilidade Celular.....	41
2.2	CIMENTOS ENDODÔNTICOS	43
2.2.1	AH Plus	44
2.2.2	Sealapex	48
2.2.3	MTA Fillapex.....	52
2.2.4	Sealepox	57
2.3	METODOLOGIA.....	60
2.3.1	Cultura celular	60
2.3.2	Reação de Griess.....	61
2.3.3	Citometria de fluxo.....	63
2.3.4	Elisa.....	64
3	PROPOSIÇÃO	67
4	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1	CIMENTOS ENDODÔNTICOS	73
4.1.1	AH Plus	73
4.1.2	Sealapex	73
4.1.3	MTA Fillapex.....	73
4.1.4	Sealepox	74
4.2	OBTENÇÃO DOS CIMENTOS.....	75
4.3	ISOLAMENTO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	76
4.4	TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	77

4.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	77
4.6	DOSAGEM DE CXCL8.....	78
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	79
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
5	RESULTADOS.....	81
5.1	CIMENTOS ENDODÔNTICOS INTERFEREM NA VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	83
5.1.1	AH Plus 24 e 48 horas.....	83
5.1.2	Sealapex 24 e 48 horas.....	85
5.1.3	MTA Fillapex 24 e 48 horas.....	87
5.1.4	Sealepox 24 e 48 horas.....	89
5.2	CIMENTOS ENDODÔNTICOS INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE CXCL8 POR NEUTRÓFILOS HUMANOS	91
5.2.1	AH Plus 24 e 48 horas.....	91
5.2.2	Sealapex 24 e 48 horas.....	93
5.2.3	MTA Fillapex 24 e 48 horas.....	95
5.2.4	Sealepox 24 e 48 horas.....	97
5.3	CIMENTOS ENDODÔNTICOS INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE NO POR NEUTRÓFILOS HUMANOS	99
5.3.1	AH Plus 24 e 48 horas.....	99
5.3.2	Sealapex 24 e 48 horas.....	101
5.3.3	MTA Fillapex 24 e 48 horas.....	103
5.3.4	Sealepox 24 e 48 horas.....	105
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS.....	121
	ANEXOS	139

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico consiste no preparo biomecânico dos canais radiculares e, posteriormente, a obturação dos mesmos com cimentos endodônticos. Segundo Leonardo e Leal (1998), a obturação é a etapa operatória do tratamento endodôntico que reflete os predicados técnicos do cirurgião-dentista e, conseqüentemente, a comprovação do sucesso obtido em todas as etapas anteriores.

Um material obturador deve apresentar boas propriedades biológicas e físico-químicas. Dessa forma, o material não deve ser irritante aos tecidos adjacentes, ao mesmo tempo propiciando um selamento dos sistemas de canais radiculares, por meio de uma obturação impermeável com auxílio de técnicas apropriadas e bem executadas.

Dentre as propriedades biológicas destaca-se a biocompatibilidade, pois, uma vez que esses materiais entram em contato direto com tecidos apicais e periapicais por um longo período de tempo, não devem ser irritantes aos tecidos, possibilitando, ou mesmo favorecendo o reparo da região periapical. Muitos parâmetros caracterizam a biocompatibilidade de um material endodôntico, como a genotoxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade. (AL-HIYASAT; TAYYAR; DARMANI, 2010).

Sabe-se que a biocompatibilidade de diferentes materiais obturadores varia consideravelmente (GEURTSSEN, 2000). A maioria dos produtos após a sua manipulação, quando ainda estão frescos, exerce algum efeito tóxico, no entanto, ao passar do tempo esse efeito é reduzido em consequência da diminuição da concentração dos seus componentes. (ARAKI; SUDA; SPANGBERG, 1994; THOM et al., 2003). Por conta disso, novos materiais obturadores têm sido formulados na tentativa de se obter melhores propriedades físicas e biológicas. (BARBOSA; ARAKI; SPANGBERG, 1993).

Atualmente, a endodontia conta com diversos tipos de cimentos endodônticos constituídos à base de resina epóxi, hidróxido de cálcio, óxido de zinco eugenol, silicone (ELDENIZ et al., 2007), e recentemente à base de MTA.

Na prática clínica os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol ainda são os cimentos mais utilizados pelos cirurgiões-dentistas (LEONARDO, 2005; LEONARDO; LEAL, 1998). São representados pelo Cimento de Grossman, Endofill (Dentsply, Maillefer), Pulp Fill (Biodinâmica), Pulp Canal Sealer (SybroEndo, EUA), apresentando-se na forma de pó e líquido. Possuem como características facilidade de trabalho, radiopacidade elevada, boa estabilidade dimensional, capacidade seladora, adesão satisfatória e bom escoamento. No entanto, a variação da proporção pó/líquido altera suas propriedades físico-químicas, além de influenciar nas propriedades biológicas (LOPES; SIQUEIRA JR, 2010).

Os cimentos obturadores à base de resina epóxica proporcionam um selamento marginal satisfatório em decorrência da sua excelente adesividade à dentina (LEONARDO, 2005). Dentre esses cimentos, o AH-Plus (Dentsply/ De Trey, Konstanz, Alemanha), um cimento do tipo epoxiaminas, é o cimento de escolha entre os cirurgiões-dentistas. Tem como características o selamento marginal, biocompatibilidade, escoamento e atividade antimicrobiana (LEONARDO et al., 1999b; SIQUEIRA et al., 2000). Entretanto, alguns estudos demonstraram uma certa citotoxicidade inicial do AH Plus, que pode estar relacionada com a liberação de formaldeído e/ou pela presença de aminas que aceleram a sua polimerização (LEONARDO et al., 1999a; ZMENER et al., 1997a).

Os cimentos contendo hidróxido de cálcio foram formulados objetivando reunir as propriedades biológicas do hidróxido de cálcio em associação com as propriedades físico-químicas esperadas por parte de um bom material obturador dos canais radiculares (LEONARDO, 2005). Um dos representantes desse cimento é o Sealapex (SybronEndo, Michigan, EUA), composto por duas pastas, uma base e outra catalisadora. Estudos mostraram que ele contribui para um melhor reparo biológico, no entanto, possui alta citotoxicidade sobre macrófagos e sobre fibroblastos, mas induz menor liberação de TNF- α por macrófagos quando comparados com os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (PERASSI et al., 2004).

O Agregado Trióxido Mineral (MTA) foi primeiramente descrito na literatura odontológica em 1993 por Lee et al. Devido a suas inúmeras características favoráveis, várias são as aplicações do MTA encontradas hoje na literatura, entre elas: alternativa ao hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) no processo de

apicificação (WITHERSPOON; HAM, 2001); (GIULIANI et al., 2002; MAROTO et al., 2003; STEINIG; REGAN; GUTMANN, 2003); (HAYASHI; SHIMIZU; EBISU, 2004; LEE, S.J.; MONSEF; TORABINEJAD, 1993) apicificação em apenas uma sessão (SHABAHANG; TORABINEJAD, 2000); retrobturação de canais, reparação de perfurações e vários outros defeitos causados por reabsorção e trauma (HOLLAND et al., 1999; TORABINEJAD et al., 1995; VIZGIRDA et al., 2004). Apesar das suas características favoráveis, o seu uso como cimento obturador é difícil em função das suas características físicas: o cimento resultante da mistura do pó e água é de difícil manipulação, possui tempo de presa elevado, de 2 horas e 45 minutos, e o tempo de trabalho menor do que 4 minutos. (GOMES-FILHO et al., 2009a).

Na tentativa de suprir essas deficiências surgiu o cimento MTA Fillapex (Ângelus, Londrina, PR, Brasil). Encontra-se na classe dos cimentos endodônticos obturadores, na subdivisão cimentos poliméricos. Trata-se de um cimento pasta/pasta, onde em uma tem-se o princípio ativo MTA e na outra uma composição a base de dissalicilato, e ao se misturar, obtêm-se um polímero iônico (ASSMANN, 2010). Tem como vantagens facilidade de uso e de manipulação, excelente escoamento, alta radiopacidade, baixa solubilidade e biocompatibilidade.

Um novo cimento obturador à base de resina epóxica, Sealepox vem sendo desenvolvido na disciplina de endodontia da FOB/USP, com bons resultados físico-químicos e de biocompatibilidade (FIDELIS, 2009).

Sabe-se que frente a uma patologia pulpar há tendência dos tecidos periapicais reagirem à agressão inflamando-se. Essa reação pode intensificar-se quando da aplicação de procedimentos endodônticos, especialmente dos preparos biomecânicos (LEONARDO, 2005; SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

As principais células imunológicas nas alterações pulpares e periapicais são os linfócitos T, os linfócitos B, células *natural killer*, plasmócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e mastócitos (STASHENKO; YU; WANG, 1992).

Diante da instalação de um processo inflamatório na região apical/periapical, estudos *in vitro* com cultura celular vêm sendo bastante utilizados pela simplicidade de se avaliar o comportamento das células diante o material obturador, possuindo a vantagem de controlar todos os fatores e as variáveis existentes. (AZAR et al., 2000; SHIMAUCHI et al., 2001; TAKEICHI et al., 1998). Além disso, sua citotoxicidade, diferentemente dos métodos histopatológicos, é mais

fácil de ser comparada pela natureza quantitativa do seu resultado (NAKAMURA et al., 1986).

Dentre muitas formas de analisar a citotoxicidade de um material obturador, a dosagem de óxido nítrico (NO) está sendo comumente mais utilizada. (AZAR et al., 2000; SHIMAUCHI et al., 2001; TAKEICHI et al., 1998). Esse gás de radical livre participa de diversos processos patológicos, tais como atividade supressora de macrófagos, inibição da adesão de leucócitos na parede endotelial, e apoptose celular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Considerando a importância das propriedades biológicas dos cimentos endodônticos, uma vez que para o reparo tecidual, tanto pulpar como o periapical, é imprescindível que os materiais obturadores não estimulem uma resposta inflamatória exacerbada, isto é, não promovam alteração no processo inflamatório, este estudo visou analisar a produção de CXCL8, a de Óxido Nítrico e a taxa de viabilidade celular dos neutrófilos humanos expostos aos cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply/ De Trey, Konstanz, Alemanha), Sealapex (SybronEndo, Michigan, EUA), MTA Fillapex (Ângelus, Londrina, PR, Brasil) e o Sealepox PR (Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, Brasil) em diferentes concentrações e tempo de presa, a fim de analisar a citotoxicidade dos mesmos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura está estruturada em 3 tópicos: inflamação, cimentos endodônticos e metodologia. Dessa forma, torna-se mais fácil o detalhamento e o entendimento referente a cada assunto.

2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação consiste em uma resposta protetora do organismo objetivando livrá-lo da causa agressora inicial e das consequências dessa lesão celular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Dessa forma, mediante a uma agressão tecidual, o organismo responde por meio do processo inflamatório, que visa eliminar ou circunscrever o agente agressor, a fim de evoluir para o processo de reparo (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

Celsus, escritor romano do primeiro século D.C. foi o primeiro a descrever os 4 sinais cardiais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Mais tarde Virchow acrescentou um quinto sinal, o da perda da função.

A resposta inflamatória é classificada em aguda e crônica de acordo com o tempo de duração, sua natureza (exsudativa/proliferativa) e pelo tipo celular envolvido.

A resposta inflamatória aguda é de curta duração, usualmente não excede 2 a 3 dias, e além de ocorrer uma reação local, também ocorre uma sistêmica. A reação local consiste em dano tecidual, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos para o local inflamado, com predomínio de neutrófilos nas fases iniciais, e macrófagos e linfócitos nas tardias, amplificando o processo inflamatório. Participam desse evento os mediadores inflamatórios, como quimiocinas, enzimas plasmáticas (bradicinina e fibrinopeptídeos), plasminina, mediadores lipídicos (tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que induzem efeitos locais, como expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, e sistêmicos, como o aparecimento da febre (BILATE, 2007). A

resolução da inflamação é um fator essencial para a manutenção da homeostasia dos tecidos. É um processo ativo e dinâmico, que limita a infiltração de leucócitos e remove as células necróticas dos locais inflamados. Sendo assim, quando bem sucedida, promove a destruição e a eliminação do agente agressor, seguida pela resolução, sendo pela reparação, e ou pela regeneração (CONSOLARO, 2009). Quando esse processo é impedido, acarreta na não resolução da inflamação, uma problemática condição que contribui para muitas doenças (AMULIC et al., 2012).

Dessa forma, quando não ocorre a resolução da inflamação, pela patogenicidade do agente agressor que consegue se evadir da resposta imune seja pela sua localização que não permite o acesso das células inflamatórias, ou quando há entrada repetitiva do agente agressor no mesmo local, ou nos casos de doenças auto-imunes, ela passa a ser crônica (CONSOLARO, 2009; BILATE, 2007). Apresenta duração variável, quase sempre por longas semanas, meses e até anos. Nesse tipo há predomínio de macrófagos e linfócitos T, onde são constantemente ativados e acumulados no local da lesão, causando significativo dano tecidual, no entanto, os fenômenos inflamatórios são menos destrutivos que os da fase aguda. As citocinas e fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos estimulam os fibroblastos vizinhos para uma fibrogênese, que aumenta as fibras colágenas, culminando em uma forma de circunscrever o agente agressor (CONSOLARO, 2009, (BILATE, 2007). Após eliminação do agente agressor e restos celulares, o processo dá início ao reparo tecidual, restabelecendo a normalidade anatômica e, ou funcional das áreas lesadas (CONSOLARO, 2009).

Assim como ocorre nas demais inflamações agudas, nas lesões periapicais agudas, a resposta inflamatória local consiste, principalmente em vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento leucocitário, mediado por fatores endógenos (prostaglandinas, cininas e neuropeptídeos). Também está envolvida a resposta imune inespecífica, mediada por polimorfonucleares neutrófilos, pela migração de monócitos e pela produção e ativação de citocinas (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

Na complementação do tratamento endodôntico, cimentos obturadores entram em contato com os tecidos do periápice, condição propicia a manter a inflamação sob forma crônica localizada (NASSRI; LIA; BOMBANA, 2003, GURGEL

FILHO, 2003). Isso faz com que ocorra proliferação da população celular local provocando proliferação de fibroblastos, acompanhada de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

2.1.1 NEUTRÓFILOS E LPS

Os neutrófilos são células do tipo leucócitos polimorfonucleares, caracterizadas por um núcleo multilobular e citoplasma granular, predominantes no sangue circulante (50 a 70%), possuem tempo de vida curto (circulam apenas cerca de 6-8 horas) quando na corrente sanguínea, e tem como principal papel na defesa do hospedeiro uma rápida resposta aos microorganismos invasores através da fagocitose. Foram descritos pela primeira vez por Elie Metchnikoff, em 1880, como sendo as primeiras células a chegarem ao local da agressão (LEHRER et al., 1988; SEGAL, 2005), constituindo a primeira linha de defesa do sistema imune. São produzidos na medula óssea, onde células hematopoiéticas pluripotentes se diferenciam em mieloblastos, e estes em granulócitos (AMULIC et al., 2012). Desde a sua formação até a sua morte por apoptose no sítio da inflamação, seu tempo de vida média varia de 1 a 2 dias (CONSOLARO, 2009).

O recrutamento de neutrófilos para o foco da infecção é um passo importante para o início da resposta inflamatória (THEILGAARD-MONCH; PORSE; BORREGAARD, 2006). O acúmulo de neutrófilos nos tecidos é uma característica do processo inflamatório, e é observado em diversas condições patológicas, como infecção, trauma, isquemia do cancro, etc... Quando a infecção bacteriana é o agente agressor, os neutrófilos são atraídos em grande número para fagocitar e matar os invasores. Sua ação sobre os patógenos se dá por meio da fagocitose, pela produção de espécies de oxigênio reativas (via mieloperoxidase), compostos intermediários do nitrogênio (NO), pelos peptídeos microbianos e outras enzimas contidas em seus grânulos (DALE; BOXER; LILES, 2008; NATHAN, 2006). Quando os neutrófilos fagocitam bactérias e não conseguem eliminá-las, sofrem citólise e derramam seu conteúdo citoplasmático, como enzimas proteolíticas, contribuindo para formação de um exsudato purulento, assim como na regurgitação enzimática, onde os neutrófilos no momento da fagocitose derramam também enzimas

proteolíticas. O seu desaparecimento da área inflamada ocorre principalmente por apoptose (CONSOLARO, 2009).

Apesar dos neutrófilos serem células fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta de defesa efetiva contra diversas doenças, a ativação exacerbada dessas células pode ser extremamente danosa para a homeostasia e gerar doença (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; MONTECUCCO et al., 2008; WALLACH; VIGNON-PENNAMEN, 2006)

A chegada dos neutrófilos no foco infeccioso é guiada por vários quimioatraentes neutrofílicos, como anafilotoxina C5a, peptídeos formil-metionil de origem bacteriana (fMLP), fator de ativação plaquetário (PAF) e leucotrieno B4 (LTB4). O PAF e LTB4 são de grande interesse, pois eles podem ser gerados pelos próprios neutrófilos, podendo, dessa forma, atuarem como auto-parácrino ou amplificadores das respostas induzidas por outros estímulos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989). Uma vez expostos aos estímulos quimiotáticos, aderem às células endoteliais, e migram para o espaço extravascular, onde vão desempenhar um grande papel sobre o agente agressor.

Por muito tempo acreditavam que os neutrófilos eram desprovidos de atividade de transcrição e pouca ou nenhuma capacidade de síntese protéica. No entanto, pelas evidências moleculares, foram dadas a eles as propriedades de sintetizar e libertar uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, e outras citocinas e fatores de crescimento (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989; CASSATELLA et al., 1995).

Estudos têm verificado que os neutrófilos produzem quimiocinas e citocinas, indicando sua ação imunorregulatória, que irão gerar atração e ativação de outros neutrófilos e de várias células envolvidas na resposta inflamatória, sendo eles os maiores responsáveis pela produção inicial após a agressão tecidual (NATHAN, 2006; SCAPINI et al., 2000). Dentre as quimiocinas, a CXCL8 está entre os principais fatores quimioatraentes e ativadores de neutrófilos (CUMMINGS et al., 1999; GODALY et al., 2000). Os neutrófilos também produzem fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) quando ativados, e estas citocinas estão envolvidas com a migração e

sobrevivência de neutrófilos e macrófagos, além de mantê-los no local onde sua concentração estiver mais elevada (ANTIGNANI; YOULE, 2007; LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005; MONTECUCCO et al., 2008). Fator de crescimento transformante α e β (TGF- α e TGF- β) e fator ativador de plaquetas também foram observados (MELANI et al., 1993).

Os neutrófilos estão associados a diversas doenças como cancro, doenças pulmonares (asma), reumatismo, e estudos demonstraram sua presença em lesões perirradiculares. A sua infiltração acarreta em inflamação e subsequente dano do tecido (lesão do órgão), além de parecer modular ainda mais a resposta do hospedeiro à lesão e inflamação por meio do aumento da produção de citocinas e ativação de mecanismos de defesa oxidativos. Nos estudos de Euler et al. (1998), os neutrófilos nas lesões perirradiculares inflamadas secretam IL-6, uma citocina que estimula a síntese do DNA dos osteoclastos e inibe a síntese de colágeno e proteínas não-colágena, sugerindo um papel direto na regulação da formação de osso, além de recrutar rapidamente mais neutrófilos para aumentar a secreção de super-óxido e atividade fagocitária, aumentando assim a lesão tecidual no foco inflamatório (AKIRA; TAGA; KISHIMOTO, 1993). Além disso, vários relatórios têm sugerido uma relação entre a progressão da lesão periapical e expressão de IL-6 e CXCL8 nos tecidos periapicais (EULER et al., 1998; HONMA et al., 1998)

A produção de citocinas é influenciada pelos agentes estimulantes, e entre estes, as endotoxinas bacterianas (LPS) são os indutores mais potentes (CASSATELLA et al., 1999).

As bactérias Gram-negativas apresentam em sua parede celular uma molécula denominada lipopolissacarídeo (LPS), também conhecida como endotoxina, que é muito nociva aos tecidos e células. De modo geral, o LPS ativa diferentes células, tais como células epiteliais, neutrófilos, fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, pela produção do receptor Toll-Like 4 (TLR4) (REMER; BRCIC; JUNGI, 2003; SOSROSENO; HERMINAJENG, 2002), promovendo a fagocitose, síntese de espécies de oxigênio reativos, citocinas e liberação de peptídeos antimicrobianos a partir de grânulos azurófilos (KINANE et al., 2007).

Ao passo que o meio oral é abundante em microrganismos, fatores de virulência bacterianos como LPS e ácidos lipoteicóico, muitas vezes podem participar das reações inflamatórias de modo isolado ou como cofatores com outras substâncias inflamatórias. Diante da proximidade do cimento endodôntico das bactérias existentes na polpa ou no ápice do dente, é possível que os fatores de virulência bacterianos tenham a capacidade de afetar a célula ou as reações teciduais para os cimentos, a não ser que eles sejam completamente removidos da área (LEE, D.H. et al., 2007).

2.1.2 CXCL8

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular sintetizadas por diferentes células do sistema imune frente a um estímulo nocivo, como infecção, tumores ou estres. Dentro dessa classe encontramos a superfamília das quimiocinas, que são pequenas moléculas de proteínas de baixo peso molecular, entre 7 a 10Kb (SCHLUGER; ROM, 1997), que têm a capacidade de influenciar em diversos aspectos da vida de uma célula, tais como a ativação, aderência e a quimiotaxia, e também na proliferação, maturação, apoptose, diferenciação, transformação maligna e disseminação celular (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

As quimiocinas foram inicialmente identificadas *in vitro* e achava-se que eram produzidas apenas pelos monócitos e macrófagos ativados. Estudos posteriores demonstraram que elas são produzidas por uma diversidade de tipos celulares, como neutrófilos, linfócitos T, monoderivados, fibroblastos, plaquetas, células endoteliais e células epiteliais (CRIPPEN; KLASING; HYDE, 1995; FURIE; RANDOLPH, 1995; HUANG, S. et al., 1992; XING et al., 1994).

As quarenta ou mais quimiocinas conhecidas são classificadas em 4 famílias de acordo com a localização de dois resíduos de cisteína N-terminais, sendo elas: CC, CXC, C e CX3C4. A família CXC tem os dois primeiros resíduos de cisteína terminais separados por um ácido amino não conservado, sendo responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos, mas não de monócitos. (MACKAY, 2001).

A CXCL8 (figura 1) é o estímulo principal para a migração de PMNS neutrófilos nas respostas inflamatórias sendo, portanto, um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos (WAGNER; ROTH, 2000). Essa propriedade é mostrada pela inibição completa de recrutamento de neutrófilos em locais de inflamação por anticorpos anti-IL8 de anticorpos monoclonais em modelos animais (FOLKESSON et al., 1995; MATSUMOTO, T. et al., 1997). Outras funções a ela atribuídas são: propriedade quimioatraente de linfócitos T e atividade angiogênica (LARSEN et al., 1989), além disso, estimula a liberação de histamina pelos basófilos (DAHINDEN et al., 1989; WHITE et al., 1989). Além dessas funções a ela atribuídas, tem-se demonstrado que CXCL8 regula muitas funções efetoras antimicrobiana dos neutrófilos pela geração de superóxido e de peróxido de hidrogênio, pela liberação de enzimas lisossomais e pela indução da explosão respiratória (PEVERI et al., 1988; THELEN et al., 1988). Dessa maneira, a quimiotaxia de neutrófilos pela CXCL8 pode estimular a atividade antimicrobiana dos neutrófilos, assim como a produção de espécies reativas de oxigênio e de mediadores pró-inflamatórios tais como CXCL8 e TNF- α (LYONS; YOSHIMURA; MCMURRAY, 2004).

Figura 1: Estrutura molecular da quimiocina CXCL8. **(A)** Localização de pontos de ligação do receptor de quimiocina. Complexo entre CXCL8 e um peptídeo N-terminal derivado do receptor CXCR1 (PDB: 1ILP). O peptídeo está ligado em uma prolongada conformação de resíduos de quimiocina da N-loop, o loop de 40 e a cadeia b3 (vermelho). O domínio N-terminal é exibido na cor laranja (LAGURI; ARENZANA-SEISDEDOS; LORTAT-JACOB, 2008). **(B)** Monômero de CXCL8/IL-8 (PDB código 1IL8) para ilustrar a estrutura típica terciária das quimiocinas e suas regiões (NT, N-terminal e CT, C-terminal). As pontes dissulfeto são exibidas como fitas vermelhas e amarelas (JOHNSON; PROUDFOOT; HANDEL, 2005)(PETERSON et al., 2006).

A produção exacerbada e persistente de CXCL8 foi demonstrada em diversas doenças inflamatórias, incluindo a inflamação pulpar (NAGAOKA et al., 1996; YANG et al., 2003). Ela é expressa em resposta ao LPS, mitógenos tais como PHA, citocinas, por exemplo, TNF- α e IL-1 β ou complexos imunes agregados (DEFORGE et al., 1992).

Estudo *in vitro* sobre a ação do cigarro sobre neutrófilos humanos na produção de CXCL8 demonstrou que a nicotina induz diretamente a produção dessa quimiocina. A quantidade máxima produzida pelos neutrófilos de indivíduos saudáveis estimulados com nicotina foi equivalente ao produzido por 10 ng / ml de LPS (IHO et al., 2003). Essa produção de CXCL8 provoca uma ligeira à moderada neutrofilia e, possivelmente, por meio do movimento linfocitose melhorada destes leucócitos (leucócitos T) quando administrada a animais experimentais.

Devido ao seu papel importante no processo inflamatório, Huang *et al.* (2005) estudaram *in vitro* os efeitos do cimento N2 e do AH Plus na expressão do mRNA das citocinas IL-6 e IL-8 em osteoblastos humanos da linhagem U2OS. Para tal fim, utilizaram os cimentos diluídos, tendo o N2 diluição final de 1:8 e o AH Plus de 1:4, e para a avaliação da expressão gênica utilizaram 4 períodos experimentais (1, 3, 6, 8, e 24 horas) e a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantificada por espectrofotometria com um comprimento de onda de absorvância de 260 nm e a pureza avaliada pela relação OD260/OD280. Os primeiros níveis significativos detectados para IL6 foram encontrados em 6 horas e 3 horas para N2 e AH Plus, respectivamente, tendo declinado após 24 horas em ambos. Em relação a expressão de IL-8, tanto para N2 e para AH Plus, seus primeiros níveis significativos foram detectados em 1 horas e permaneceu elevada durante todo o período de incubação de 24 horas. Seus resultados mostraram que houve maiores níveis de expressão para IL-8, e que os níveis mais elevados para IL-6 e IL-8, respectivamente, ocorreram em 6 horas para ambos os cimentos e 8 horas para N2 e 24 horas para AH Plus. Devido a capacidade de estimular o gene mRNA de IL-6 e IL-8, esses dados sugerem que a ativação dessa expressão pode ser um dos mecanismos utilizados por esses dois cimentos na indução da inflamação periapical (HUANG, F.M. et al., 2005).

2.1.3 Óxido Nítrico

Em 1987 Palmer et al. descobriram que células vasculares endoteliais eram capazes de sintetizar Óxido Nítrico (NO) a partir da L-arginina (QUEIROZ; BATISTA, 1999). Sua produção ocorre pela indução da enzima óxido nítrico sintase nas células imunes em resposta as diversas citocinas, tais como TNF- α , IFN- α e IL-2 (JANEWAY JR; TRAVES, 1997). Dessa forma, a enzima óxido nítrico sintase ou sintetase (NOS) converte a L-arginina em NO e L-citrulina.

O óxido nítrico é produzido pelas células do sistema imunológico (células dendríticas, células NK, mastócitos e células fagocíticas, incluindo monócitos, macrófagos, células microgliais de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos), assim como por outras células envolvidas nas reações imunológicas (células endoteliais, células epiteliais, células do músculo liso vascular, fibroblastos, condrócitos, queratinócitos, hepatócitos, células mesangiais e Células de Schwann) (BOGDAN, 2001).

Atualmente são conhecidas 3 isoenzimas relacionadas à produção de NO, a neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou NOS 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3), sendo que a iNOS foi originalmente purificada e clonada a partir de macrófagos ativados (LOPEZ-FARRE et al., 1998; SARIH; SOUVANNAVONG; ADAM, 1993).

Esse composto está envolvido em muitos processos fisiológicos, como na neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade de defesa do sistema imunológico em destruir células tumorais e parasitas intracelulares. Além disso, possui ação farmacológica, tais como relaxante vascular, inibidor da agregação plaquetária e citoprotetor (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Durante as respostas inflamatórias, o recrutamento de leucócitos e sua adesão também são regulados por iNOS (LEFER et al., 1999). A quimiotaxia dos leucócitos é influenciada pelo óxido nítrico através de diversos mecanismos, tais como modular a produção de quimiocinas (IP-10, proteína quimiotática de monócitos-1 e proteína inflamatória de macrófago-1 α e -2) (MACH et al., 1999; TRIFILIEFF et al., 2000) e inibição da atividade das quimiocinas (como CXCL8) através do peroxinitrito dependente de nitração da tirosina e da função como um mensageiro intracelular nas vias de sinalização da quimiocina (BOGDAN, 2001).

O óxido nítrico desempenha diversos papéis nas reações inflamatórias, melhorando a vasodilatação e edema (por terminações nervosas sensoriais e modulação da atividade dos leucócitos) a citotoxicidade do tecido (LASKIN; HECK; LASKIN, 1998), além de danificarem as células alvo. Altas doses de NO pode provocar necrose e morte celular por apoptose (JOHANN et al., 2007; OKUDA et al., 1996).

Shimauchi *et al.* (2001) observaram elevada quantidade de óxido nítrico em exsudatos de lesões periapicais recolhidos durante tratamento endodôntico, além de altos níveis de CXCL8. Altos níveis de CXCL8 foram observados em pacientes com sintomas dolorosos, porém os níveis de NO não foram correlacionados com sintomas clínicos. Sendo assim, a produção de óxido nítrico tem sido correlacionada com a manutenção da resposta inflamatória e destruição tecidual.

No estudo *in vitro* de Mendes et al. (2003) a citotoxicidade dos cimentos Pulp Canal Sealer EWT e Endofill sobre a atividade de macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c foi analisada pela liberação de óxido nítrico (NO), produção de interleucina-12 (IL-12), adesão dos macrófagos e atividade fagocitária. Para tal, os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante, inseridos em tubos capilares de vidro estéreis com diâmetro de 2 mm, os quais foram cortados em fragmentos de 0,5 mm. Os testes foram feitos a partir dos cimentos recém-misturados, ainda frescos, e após 24 horas da sua manipulação. Para analisar a produção de óxido nítrico, as células peritoneais foram cultivados em placas de 24 poços (2×10^6 células/ poço/ mL), na ausência ou presença de 250 UI / ml de interferon- γ (IFN- γ) com tubos capilar contendo o cimento, tendo como grupo controle célula com tubo capilar vazio. Após 48 horas de cultivo, o sobrenadante foi colhido e realizada a dosagem de NO pelo método de Griess. A produção de NO induzida pelo interferon- γ foi inibida na presença dos dois cimentos, não tendo diferença entre os testes com os cimentos recém-misturados e tomado presa. Níveis mais baixos de NO foram observados nos macrófagos não estimulados com interferon- γ , e na presença dos cimentos sua indução foi inibida. Pode-se concluir que os cimentos tiveram um efeito inibidor sobre as respostas efectoras (fagocitose e produção de óxido nítrico), independentemente do tempo de presa (DE OLIVEIRA MENDES et al., 2003).

Mariano et al. (2012) compararam, *in vitro*, a produção de péptidos antimicrobianos (PNH 1-3 e LL-37) e do NO por lipopolissacarídeo (LPS) em neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis e de pacientes com periodontite crônica. Para tal, os neutrófilos de sangue periférico foram cultivados na presença ou ausência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-LPS (Aa-LPS), *Porphyromonas gingivalis*-LPS (Pg-LPS) e *Escherichia coli*-LPS (Ec-LPS). A produção dos peptídeos antimicrobianos foi quantificada através de qRT-PCR e pelo método de ELISA, e o Óxido Nítrico dosado pela reação de Griss. Os neutrófilos foram cultivados em placas de 24 poços (1×10^7 neutrófilos/poço), estimulados com 100ng/mL de Aa-LPS, Pg-LPS ou Ec-LPS por 6 e 12 horas. Após incubação, o sobrenadante foi armazenado para dosagem de HNP 1-3, LL-37 e NO, e os neutrófilos foram utilizados para a extração total de mRNA para análise da expressão do gene PNH 1-3 e de LL-37. De acordo com os resultados obtidos, os neutrófilos de pacientes com periodontite estimulados com Pg-LPS ou Ec-LPS e cultivados sem estímulos produziram níveis de NO significativamente mais baixos quando comparados com os neutrófilos de indivíduos saudáveis para o período de 6 horas. No período de 12 horas os níveis de NO foi significativamente inferior em neutrófilos de pacientes com periodontite estimulados com Pg-LPS e Ec-LPS em comparação com os neutrófilos de indivíduos controle. Os neutrófilos de pacientes com periodontite e de indivíduos saudáveis estimulados com Aa-LPS produziram níveis equivalentes de NO para os períodos de 6 e 12h. Diante dos resultados concluíram que essa diferença significativa na produção de NO entre os indivíduos normais e com periodontite indicam que a produção dessa molécula pode influenciar na susceptibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento de importantes patógenos periodontais.

2.1.4 Viabilidade Celular

Apoptose é um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada. Ocorre em diferentes tipos de células e desempenha um papel importante na homeostasia do tecido em respostas a diferentes estímulos. Os estímulos ambientais que induzem apoptose, por exemplo, os hormônios, não são eles propriamente fatais, a morte ocorre apenas nas células condicionadas para

responder a eles. Nesse processo ocorrem diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980).

As células que morrem por *necrose celular* em consequência de lesão aguda, incham e explodem. Elas derramam seu conteúdo em toda a sua vizinhança, causando prejudicialmente uma resposta inflamatória. Por consequência, uma célula que morre por apoptose, não causa danos aos seus vizinhos (ALBERTS et al., 2002).

O processo apoptótico pode ser dividido em 3 fases: a primeira é a iniciação, na qual a célula recebe o estímulo que induz a sua morte; a segunda é a execução, onde se constata as maiores modificações morfológicas e bioquímicas; e a terceira e última consiste na eliminação, em que ocorre a degradação dos restos celulares pelos macrófagos e células adjacentes.

A apoptose é mediada pelas enzimas proteolíticas, as caspases, por meio de clivagem de proteínas específicas no citoplasma e núcleo. Caspases existem em todas as células como precursores inativos, ou pró-caspases, que são geralmente ativados por clivagem por outras caspases. O processo é iniciado por ativação tanto com sinais de morte intracelular (stress biológico com liberação do citocromo c mitocondrial) ou extracelular (sinais que se unem aos seus ligantes nas células alvo) (HENGARTNER, 2000; PAVLAKIS; LIPMAN; STROM, 1996), que causam moléculas adaptadoras intracelulares para agregar e ativar pró-caspases. A ativação da caspase é regulada pelos membros das famílias das proteínas Bcl-2 e de IAP (ALBERTS et al., 2002).

A apoptose de neutrófilos e ingestão por macrófagos é o mecanismo principal na limpeza dos neutrófilos que foram recrutados para o foco inflamatório e, assim, para a promoção da resolução da inflamação (COX; CROSSLEY; XING, 1995; SAVILL, 1997). Dessa forma, uma vez desempenhado o papel dos neutrófilos no combate dos agentes agressores, os mesmos morrem por meio de um programa embutido, a morte celular, sendo que, a morte dos neutrófilos é influenciada por mediadores inflamatórios, como GM-CSF e LPS, e por condições ambientais como a hipóxia, todos os quais prolongam a sobrevivência de neutrófilos (AMULIC et al., 2012).

2.2 CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Podemos observar que ao longo da história da Endodontia surgiu uma grande variedade de materiais obturados, visando contemplar, o melhor possível, os princípios físico-químicos e biológicos estabelecidos para se obter um selamento hermético dos sistemas de canais radiculares, e por fim, não agredir os tecidos apicais/periapicais.

Grossman em 1978 estabeleceu dez requisitos que um material obturador deve apresentar, sendo eles: (GROSSMAN, 1978)

1. Fácil introdução no canal;
2. Selamento lateral e apical do canal;
3. Estabilidade dimensional;
4. Impermeabilidade à umidade;
5. Deve ser bacteriostático ou pelo menos não incentivar o crescimento bacteriano;
6. Radiopacidade;
7. Não deve manchar estrutura dentária;
8. Não ser irritante ao tecido periapical;
9. Deve ser estéril, ou passível de esterilização;
10. Quando necessário, de fácil remoção do interior do canal radicular.

Segundo Sundqvist & Figdor (1998), os materiais obturados devem possuir três funções primárias: a de impedir, via coroa, a entrada de bactérias da cavidade oral no interior do canal (vedação coronária); sepultar os microrganismos remanescentes; e obturação completa em nível microscópico, impedindo o acúmulo de fluido que serve como nutrientes para as bactérias.

A biocompatibilidade dos materiais obturadores é um requisito de suma importância, pois os componentes tóxicos presentes na sua composição podem irritar, ou até mesmo degenerar os tecidos circunvizinhos, uma vez que, muitas vezes, entram em contato direto com os tecidos periapicais, especialmente nos casos de extravasamento (HUANG, F.M. et al., 2005).

Na tentativa de se obter um material obturador ideal, cada vez mais pesquisas têm sido realizadas para esse fim. Um dos principais meios para avaliar se um material obturador é adequado para aplicação clínica é a análise das suas características biológicas (por exemplo, citotoxicidade e genotoxicidade) (GEURTSSEN; LEYHAUSEN, 1997; LEYHAUSEN et al., 1999; OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981). Para isso, testes *in vitro* utilizando culturas de células têm sido preconizados (GEURTSSEN et al., 1998; LEYHAUSEN et al., 1999; NAKAMURA et al., 1986; SCHWEIKL et al., 1995), além dos ensaios “in vivo” com tubos de teflon implantados no subcutâneo de rato (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; STUART et al., 1979).

2.2.1 AH Plus (Dentsply/ De Trey, Konstanz, Alemanha)

O cimento AH Plus é um cimento à base de resina epóxi derivado do cimento AH 26, sendo apresentado em forma de 2 pastas, uma pasta base e outra catalisadora (LEONARDO, 2005). É composto por resinas epóxicas, óxido de zircônio, óxido de ferro, tungstato de cálcio e óleo de silicone. Diversos autores demonstraram sua boa capacidade de vedação (DE ALMEIDA et al., 2000; LIMKANGWALMONGKOL et al., 1991; YARED; BOU DAGHER, 1996), além de outra importante característica, a atividade antimicrobiana (LEONARDO et al., 2000).

Devido as suas excelentes propriedades, cimentos à base de resinas sintéticas têm sido utilizados por muitas décadas, e um dos representantes dessa classe, o AH Plus vem sendo frequentemente utilizado como material de controle nas pesquisas (ØRSTAVIK, 2005).

Embora o fabricante venda o AH Plus como um cimento isento de formaldeído, estudos tem demonstrado que na sua reação de polimerização, que ocorre entre a resina epoxi e as aminas, há liberação de formaldeído (COHEN et al., 1998; LEONARDO et al., 1999a), um composto que tem sido correlacionado com a indução de respostas não-neoplásicas, degeneração epitelial e um infiltrado celular inflamatório misto (MORGAN; GROSS; PATTERSON, 1983), além da reação alérgica e necrose do tecido conjuntivo (DI FELICE; LOMBARDI, 1998; KAPLAN et al., 2003). Uma vez que um dos objetivos do tratamento endodôntico é a reparação

dos tecidos apicais/periapicais inflamados, a presença, mesmo de uma quantidade mínima desse composto, pode agir como um irritante, impedindo ou mesmo retardando o processo de reparo (LEONARDO et al., 1999a).

Cohen et al. 2000, pela técnica da difusão em ágar utilizando células L929 de fibroblastos de rato, avaliaram, *in vitro*, a citotoxicidade dos cimentos AH Plus e AH26, ambos cimentos à base de resina epóxi, por meio da reatividade biológica (degeneração celular e malformação), e observaram reatividade grave de ambas as culturas celulares nas primeiras 48 horas, o que determinou seus carácter citotóxicos, sendo que o grau de liberação do formaldeído diminuiu após esse tempo, demonstrando maior citotoxicidade quando ainda estão frescos..

Oztan et al. 2003 analisaram a citotoxicidade dos cimentos AH Plus e Roeko Automix Seal (RSA), um cimento a base de silicone, em células L929 de fibroblastos de rato após período experimental de 24, 48 e 72 horas de exposição, usando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e contagem de células viáveis pela técnica de exclusão do corante azul de tripano. Foram realizados dez experimentos para cada material e período experimental. Os cimentos foram manipulados conforme as instruções do fabricante e colocados em placas de seis poços preenchendo uma área de 1 cm de diâmetro. Após 24 horas adicionaram 6 mL de DMEM e incubaram por 48 horas em 37° C numa atmosfera de CO₂ 5% em 100% de umidade relativa do ar. Após esse período o meio foi aspirado e utilizado como material experimental. As células foram cultivadas como culturas em monocamada na concentração de 3x10⁴ células/mL dispostas em placas de 96 poços, estimuladas com os substratos e realizados os experimentos. Os resultados dos ensaios demonstraram que o AH Plus e RSA não possuem diferença estatisticamente significativa no grau de toxicidade, no entanto, essa diferença ocorre entre 24 e 48 horas e 24-72 para ambos os cimentos. Concluíram que os efeitos citotóxicos dos cimentos com o tempo não foram consideradas estatisticamente diferentes e que os cimentos AH Plus e RSA possuem níveis semelhantes de baixa toxicidade para células L929 de fibroblastos de rato.

Sousa et al. 2006 avaliaram a biocompatibilidade intra-óssea de 3 cimentos endodônticos, o AH Plus, EndoREZ e Epifhany, por meio da análise e avaliação da intensidade inflamatória. Para isso utilizaram 30 porcos guinea,

divididos em 10 para cada grupo de cimento e com períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Cada animal recebeu dois implantes de Teflon, um de cada lado da sínfise mandibular contendo os respectivos cimentos, de uma forma que o material permanecesse em contato com o osso. Após os períodos experimentais, os animais foram mortos e as peças foram preparadas para a análise histológica. A resposta do tecido conjuntivo em contato com a parede lateral do tubo de Teflon serviu como controle negativo. Os resultados foram classificados como ausente, leve, moderada e grave, dependendo da presença ou ausências de células inflamatórias, materiais dispersos, osso saudável recém-formado, cápsula, tecido necrótico e reabsorção. O parâmetro adotado para um cimento ser considerado biologicamente aceitável foi: ausência ou leve reação em ambos os períodos experimentais, ou reação moderada em 4 semanas que diminuiu em 12 semanas. Como resultado obtiveram que a reação tecidual inflamatória produzida pelo EndoREZ foi considerada grave, sendo que no grupo do AH Plus, a reação passou de grave para moderada, e no grupo do Epiphany observou-se a compatibilidade biológica, com formação óssea e ausência de reação inflamatória. O que pode explicar a resposta inflamatória do AH Plus é a liberação de formaldeído (COHEN et al., 1998; LEONARDO et al., 1999a), e a presença de aminas na sua composição, que aceleram a polimerização (ZMENER et al., 1997a).

Bouillaguet et al. 2006 avaliaram a citotoxicidade de 4 cimentos endodônticos, o AH Plus, Epiphany, Resilon e GuttaFlow, além dos primers líquidos (Epiphany e do GuttaFlow) e os solventes da resina (água, acetona, HEMA, etanol). A citotoxicidade foi medida pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em culturas de células Balb / c 3T3 (fibroblastos CCL 163, American Type Culture Collection, Rockville, MD) em dois períodos experimentais, de 24 e 72 horas. Os cimentos foram preparados conforme instruções do fabricante, inseridos em moldes de Teflon (10 x 1 mm) e colocados em contato com a cultura. Para os ensaios com os primers e os solventes, foi adicionado 5 µL diretamente na cultura. Como resultado encontraram que para 24 horas a resposta citotóxica diminuiu em uma ordem de: Resilon > Ephifany > AH Plus > Gutta-Flow; e para 72h: Resilon > AH Plus > Ephifany > Gutta-Flow. Os dados sugeriram diferenças significativas entre os cimentos, entretanto, a maioria apresentou significativos riscos citotóxicos, que aumenta com o tempo, independentemente do cimento. A maior

citotoxicidade tardia do AH Plus pode estar relacionada à sua atividade antibacteriana, sugerindo que os componentes liberados a partir do material também possuem a capacidade de induzir uma resposta tóxica (KAYAOGLU et al., 2005), e também pela presença de porosidades em cimentos mistos, que pode favorecer a liberação dos componentes que não reagiram durante a reação de polimerização (MUTAL; GANI, 2005).

Scarparo et al. (2009) investigaram histologicamente a biocompatibilidade dos cimentos EndoREZ (à base de resina metacrilato), AH Plus (à base de resina epóxi) e Endofill (à base de óxido de zinco e eugenol) no tecido conjuntivo subcutâneo de rato em diferentes períodos experimentais: 7, 30 e 60 dias. Foram utilizados 18 ratos Wistar, divididos em 4 grupos: grupo I, EndoRez; grupo II, AH Plus; grupo III, Endofill; e grupo IV, grupo controle (tubo de polietileno vazio). Os cimentos foram manipulados conforme as instruções do fabricante e introduzidos nos tubos de polietileno (10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro) e estes inseridos no dorso com uma das extremidade aberta de cada tubo. No final de cada período experimental, os animais foram mortos e realizada a biópsia da área do implante com uma margem de segurança de 1 cm, e as amostras foram fixadas, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina. Cada amostra teve 3 sessões analisadas sob microscópio de luz. A resposta inflamatória foi analisada pela presença de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes, sendo classificada na seguinte forma na escala: 1- ausente (células dentro dos vasos ou ausente); 2- leves; 3- moderada (presente, mas esparsas ou em grupos reduzidos); e 4- intensa (células presentes na forma de infiltrado). O tecido fibroso foi classificado de acordo com a seguinte escala: 1- ausência de fibras de colágeno, 2- presença de uma fina camada de fibras colágenas, e 3- presença de uma espessa camada de fibras de colágeno. A formação de abscesso foi classificada da seguinte forma: 1- ausência de abscesso, 2- presença de abscesso em contato com a cavidade cirúrgica, e 3- presença de áreas de abscesso distante da cavidade cirúrgica. Os resultados demonstraram intensa reação inflamatória (grau 4) nos períodos experimentais para o EndoRez, com intenso infiltrado mononuclear após 30 dias. Em resposta ao AH Plus após 30 dias houve presença de um infiltrado linfoplasmocitário moderado (grau 3) e de condensação fibrosa grossa (grau 3), sendo que as células inflamatórias tenderam a diminuir durante os três

períodos experimentais. A reação histopatológica ao EndoFill foi intensa após os 3 períodos experimentais, sendo que após 60 dias foram observados abscesso (grau 2) e macrófagos nas regiões. No grupo controle houve uma redução nas células inflamatórias e um aumento nas fibras colágenas, apresentando após 60 dias tecido cicatricial e condensação fibrosa espessa (grau 3). Os autores concluíram que o EndoREZ e Endofill apresentaram uma mais intensa e mais duradoura inflamação, sendo que em resposta ao AH Plus esta reação inflamatória diminuiu ao longo do tempo. No entanto, nenhum dos cimentos testados apresentou ter características ideais para biocompatibilidade.

De acordo com a norma ISO, o cimento AH Plus não apresenta variação de citotoxicidade ao longo do tempo devido a sua inexistência, ou próximo de zero de acordo com a técnica rootdipping (CAMPS; ABOUT, 2003)

2.2.2 Sealapex (SybronEndo, Michigan, EUA)

Com o intuito de agrupar as excelentes propriedades biológicas do hidróxido de cálcio e as propriedades físico-químicas de um material obturador ideal, surgiu o cimento endodôntico Sealapex (LEONARDO et al. 2005). É apresentado em 2 pastas, uma base e outra catalisadora, composto por: óxido de cálcio, trióxido de bismuto, óxido de zinco, sílica sub-micron, estearato de zinco, dióxido de titânio, fosfato tricálcico; mistura, etil tolueno sulfonamida, poli (metileno salicilato de metil), resina isobutil salicilato (SCELZA; COIL; ALVES, 2012). Apresenta maior capacidade seladora do que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (FACER; WALTON, 2003), contribui para um melhor reparo quando comparado ao hidróxido de cálcio puro (SONAT; DALAT; GUNHAN, 1990).

Geurtsen et al. (1998) avaliaram a citocompatibilidade dos cimentos endodônticos AH26, Apexit, Sealapex, N2 e guta-percha em função do tempo (24 horas, 5 dias, 5 dias e 24 horas) sobre os danos celulares decorrentes desses materiais em monocamadas de células 3T3 permanentes e fibroblastos primários do ligamento periodontal humano (FPLH) por meio da determinação da proliferação celular com o fluorocromo propidiumiodeto. Os resultados demonstraram que nenhum dos extratos de guta-percha e Apexit reduziram significativamente a proliferação celular em comparação com o controle. Em contraste, todos os extratos

de AH26, Sealapex e N2 claramente induziram efeitos citotóxicos, causando inibição do crescimento moderado ou grave significativo. No entanto, os efeitos citotóxicos do AH26 e Sealapex foram significativamente menores do que o N2 em culturas de 3T3 ($p < 0,05$). Dessa forma, a citocompatibilidade em ordem crescente para as células 3T3 foi: controle = Apexit = gutapercha > AH26 > Sealapex > N2 (citotoxicidade mais alta), e para as células FPLH: controle = Apexit = gutapercha > Sealapex > AH26 > N2 (citotoxicidade mais alta).

Camps e About (2003) compararam a citotoxicidade de três cimentos endodônticos (AH Plus, Cortisomol e Sealapex) testados com as normas ISO em relação a técnica de raiz-dipping em três períodos experimentais, de 1, 2, e 30 dias. Para isso realizaram culturas com fibroblastos L929 e o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Os cimentos foram manipulados conforme o fabricante e as amostras armazenadas em 1 ml de DMEM e realizada a cultura com o meio de ensaio, posteriormente submetidos ao ensaio MTT. Na técnica raiz-dipping foram utilizados 30 dentes unirradiculados que tiveram sua coroa cortada. O canal foi instrumentado com o sistema ProFile, e as raízes divididas em 3 grupos, sendo 10 para cada cimento. Os canais foram obturados com gutapercha e o cimento em teste pela técnica da condensação lateral ativa. Em seguida as raízes foram armazenadas durante 24 horas a 37 ° C e 100% de umidade, e após esse período, o ápice das raízes foi mergulhado em 1 ml de meio de cultura por 1, 2, e 30 dias com renovação do meio diariamente, sendo que o último contato com o ápice foi utilizado o meio para medir a citotoxicidade sob as mesmas condições que as normas ISO (função respiratória de fibroblastos L 929 avaliada pelo ensaio de MTT). Os resultados mostraram que o Cortisomol e o Sealapex foram mais citotóxicos do que o AH Plus em 1 dia, e para 2 e 30 dias, o Sealapex apresentou maior citotoxicidade que o Cortisomol e este maior que o AH Plus, sendo que a citotoxicidade do AH Plus e Sealapex não variou ao longo do tempo, enquanto que a do Cortisomol diminuiu com o tempo. Na técnica de imersão das raízes, o Cortisomol foi mais citotóxico que o Sealapex, o qual foi mais citotóxico que o AH Plus em 1 dia, e nos períodos de 2 e 30 dias o Cortisomol foi mais citotóxico do que AH Plus, que foi mais citotóxico que o Sealapex, sendo que em função do tempo, a citotoxicidade do AH Plus e Cortisomol não diminuiu ao longo do tempo, enquanto que a do Sealapex diminuiu. Devido a porcentagem de morte

celular terem sido tão baixas, os cimentos podem ser considerados não citotóxicos de acordo com essa técnica

Veloso et al. 2006 analisaram a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio no comportamento tecidual em subcutâneo de ratos após implantes de tubos de polietileno preenchidos com os cimentos Sealapex, Apexit e Sealer 26, em quatro intervalos de tempo: 48 horas, 7, 21 e 60 dias. Para tanto, utilizaram 60 ratos machos Wistar, divididos em oito grupos: quatro grupos experimentais com 10 ratos cada, e quatro grupos controle, com cinco ratos. Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, introduzidos em tubos de polietileno (10 x 1,5mm) com uma extremidade fechada, inseridos na área escapular direita (Sealapex), escapular esquerda (Sealer 26) e na área dorsal pélvica direita (Apexit), e os grupos controles receberam tubos vazios nas mesmas áreas. Para 48 horas, todos os cimentos apresentaram reações inflamatórias graves, em 7 dias todos os cimentos foram considerados moderados, em 21 dias apenas o Sealapex com média ou discreta inflamação, os demais com moderada, e para 60 dias reação inflamatória leve para o Sealapex e moderada para os outros dois. O Sealer 26 obteve o pior desempenho, sendo que para 48 horas e 7 dias o Apexit apresentou os menores valores de células inflamatórias, enquanto que para 21 e 60 dias, as menores quantidades de células foram encontradas para o Sealapex. Sendo assim, a média do número de neutrófilos foi significativamente maior para os animais no grupo de 48 horas para todos os cimentos, o grau de inflamação foi moderado para 48 horas, média para 7 dias e leve para 21 e 60 dias. Concluíram que todos os cimentos foram irritantes, no entanto, a intensidade variou entre cada cimento e em função do tempo; o cimento Sealapex foi o mais biocompatível, seguido pelo Apexit e Sealer 26, sendo que o Sealer 26 induziu um maior número de células inflamatórias em todos os períodos de estudo.

Lee et al. (2007) avaliaram *in vitro* a expressão do mRNA para ciclooxigenase-2 (COX-2) em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 frente a estimulação com LPS e 3 cimentos endodônticos (AH26, Sealapex e N2). Os cimentos foram manipulados conforme instrução do fabricante e adicionado 2mL de meio de cultura (DMEM contendo SFB 10%) em 100 mg de cada cimento. Após 24 horas na incubadora, a solução foi filtrada e diluída em série em meio de cultura. A viabilidade celular foi analisada por meio do kit de contagem de células-8 (WST-8) e

a expressão gênica da COX-2 por meio da reação em cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR). Em seus resultados observaram que o LPS estimulou um acúmulo de mRNA de COX-2 por até 24 horas, não sendo detectada essa produção nas células de controle não tratadas. Os cimentos endodônticos em seus menores níveis de diluição não tóxicos (Sealapex, 20x; AH26, 50x e N2 Universal, 70x) induziram a expressão de mRNA para COX-2. Nenhum dos cimentos testados foram capazes de sustentar a expressão para COX-2 por 24 horas. O efeito dose-resposta também foi analisado após 5 horas de estimulação, sendo que com a diminuição das concentrações dos cimentos, a expressão da COX-2 também diminuiu. Concluíram que os cimentos não são capazes de induzir continuamente a transcrição do mRNA para COX-2, ou que a transcrição não são tão estáveis como os gerados pelo LPS. Além disso, a expressão de mRNA, um marcador útil das respostas inflamatórias, é causada pela combinações de LPS com Sealapex ou N2 Universal, sendo a expressão da COX-2 dose-dependente.

Scelza et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade dos cimentos Sealapex, Real Seal SE, AH Plus, GuttaFlow, Roth 801 e ThermaSeal Plus em diferentes tempos de extração (1, 7, 14, 21 e 28 dias) sobre a viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Os cimentos foram manipulados de acordo com o fabricante, incubados em meio de cultura (DMEM) durante os tempos estabelecidos com lavagem diária. Os fibroblastos foram estimulados com os cimentos e após 24 horas a viabilidade celular foi analisada por MTT. No período de 1 dia, o GuttaFlow foi significativamente menos citotóxico que todos os outros cimentos. Para o período de 7 dias, a viabilidade celular foi aumentada para GuttaFlow, AH Plus e ThermaSeal Plus. Aos 14 dias, a viabilidade celular aumentou para todos os cimentos, exceto para o Sealapex, que foi altamente citotóxico, enquanto que nos períodos de 21 e 28 dias não houve diferenças significativas entre os cimentos. O cimento GuttaFlow foi o menos citotóxico, e o Sealapex foi fortemente citotóxico nos períodos de 1, 7 e 14 dias, sendo que a citotoxicidade de todos os cimentos parece diminuir de uma forma tempo-dependente.

Em contraste com os achados desse estudo, Chang et al. 2010 obtiveram que o Sealapex apresentou citotoxicidade moderada à fibroblastos do ligamento periodontal no período de 3 e 18 horas. Essa citotoxicidade foi relacionada aos

componentes / aditivos como resina metil-polimetileno salicilato e salicilato de isobutil.

2.2.3 MTA Fillapex (Ângelus, Londrina, PR, Brasil)

Em 1999, Holland et al. sugeriram o uso de cimento de MTA como um material de preenchimento (HOLLAND et al., 1999).

O cimento MTA Fillapex é um cimento à base de Agregado Trióxido Mineral (MTA) que surgiu em 2010 visando as excelentes propriedades físico-químicas e biológicas do MTA para o uso como cimento obturador.

O MTA tem sido comumente utilizado como um material de reparação e é composto de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido de tricálcio e óxido de silicato (TORABINEJAD; WATSON; FORD, 1993). Foi desenvolvido como um material retrobturador e tem sido utilizado para selar perfurações, como barreira apical em dentes com ápices abertos, em pulpotomias entre outros. É um material biocompatível que produz hidróxido de cálcio, o qual é liberado na solução e induz a formação de tecido mineralizado a partir da hidroxiapatita; além disso, estudos têm provado seu poder de estimular a liberação de citocinas a partir de células ósseas, que promove a formação de tecido mineralizado. (CAMILLERI, 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010a; TORABINEJAD; PARIROKH, 2010).

Apesar das suas características favoráveis, possui propriedades físicas que impedem a sua utilização como cimento obturador (ROBERTS et al., 2008a). O cimento resultante da mistura pó/água é de difícil manipulação, possui tempo de presa elevado, de 2 horas e 45 minutos, e o tempo de trabalho menor do que 4 minutos. (GOMES-FILHO et al., 2009a).

Dessa maneira, a necessidade de um material biocompatível, que induz a formação de tecido mineralizado, e que ofereça uma manipulação, tempo de presa e de trabalho adequados, levou ao desenvolvimento de cimentos baseados em MTA.

O MTA Fillapex, que já está disponível no mercado, é um cimento com compostos resinosos, radiopacidade excelente, de fácil manuseio e tempo de trabalho grande, tendo como composição resina de salicilato, resina diluída, resina

natural, trióxido de bismuto, sílica nanoparticulada, MTA e pigmentos (MORGENTAL et al., 2011). Possui tempo de trabalho de 30 minutos e tempo de presa mínimo de 120 minutos. No entanto, poucos estudos têm se desenvolvido para analisar o seu comportamento físico-químico e biológico.

Morgental et al em 2011 analisaram a atividade antibacteriana dos cimentos Endo CPM Sealer e MTA Fillapex frente **Enterococcus faecalis** (ATCC 29212), tendo como controle os cimentos MTA branco e Endofill. Os microrganismos foram cultivados em Brain Heart Infusion - caldo BHI, a 37 ° C durante 18h. Em seguida, uma suspensão bacteriana foi preparada com 0,85% de solução salina para coincidir com a turbidez equivalente a 1,0 tubo padrão McFarland, correspondente a 3×10^8 CFU mL⁻¹. Foi utilizado o teste de difusão em ágar (ADT) para avaliar a efeito antes da tomada de presa. Os materiais foram colocados em quatro poços equidistantes feitos em dez placas de ágar, incubados a 37 ° C durante 2 dias; após esse período as zonas de inibição foram medidas em milímetros com paquímetro digital. Para avaliar o efeito antibacteriano utilizou-se o teste de contato direto (DCT). Suspensões dos materiais (cimento + solução salina, [50 mg mL⁻¹]) foram preparados e misturados com **E. faecalis** (volumes iguais (500µL) de suspensões bacterianas e dos materiais). A sobrevivência das bactérias foi avaliada após 1, 6, 15 e 60 min, usando 10 diluições em série e cultivadas em placas de ágar em triplicata. Após a incubação, UFC mL⁻¹ foram calculadas. Mediram também os valores de pH das suspensões após esses períodos, e foram correlacionados com os resultados da atividade antibacteriana. Os resultados obtidos na ADT mostraram que o Endofill apresentou a maior zona de inibição, semelhante ao MTA Fillapex, sendo que o MTA branco e Endo CPM Sealer difundiram-se em ágar, mas não inibiram o **E. faecalis**. Para a DCT, nenhum dos materiais tiveram ação antimicrobiana contra **E. faecalis**, não havendo diferenças significativas ao longo dos períodos experimentais. Para os valores médios de pH, o MTA branco e Endo CPM Sealer apresentaram pH > 11 em todos os períodos experimentais, sendo que o MTA Fillapex e Endofill apresentaram valores inferiores, mas também alcalino. Dessa forma, MTA Fillapex e Endofill tiveram um efeito contra **E. faecalis**, mas não mantiveram essa atividade antibacteriana 7 dias após a mistura. O MTA branco e Endo CPM Sealer apesar do seu pH alcalino, não possuem atividade antibacteriana, nem antes ou após o ajuste.

Gomes-Filho et al. (2012) avaliaram a reação tecidual em subcutâneo de ratos Wistar ao implante de tubos de polietileno preenchidos com o cimento MTA Fillapex em comparação com os cimentos Sealapex e MTA Ângelus em diferentes períodos experimentais (7, 15, 30, 60 e 90 dias), bem como a capacidade de estimular a mineralização. Foram realizadas avaliações qualitativas e quantitativas da reação tecidual. Os cimentos foram manipulados conforme as instruções dos fabricantes, inseridos nos tubos de polietileno (diâmetro de 1,0 mm interno, diâmetro externo de 1,6 mm e comprimento de 10,0 mm) e implantados no dorso de cada animal que recebeu 4 tubos. Após cada período experimental, os animais foram mortos, os tubos com tecidos adjacentes removidos, fixados e as amostras processadas, seccionadas e coradas, sendo que algumas permaneceram não coradas para observação sob luz polarizada (marcação de estruturas mineralizadas). As reações inflamatórias no tecido em contato com o material foram pontuadas da seguinte forma: 0, nenhuma ou poucas células inflamatórias e sem reação; 1- < 25 células e reação leve; 2, entre 25 e 125 células e reação moderada; e 3- 125 ou mais células e severa reação. A cápsula fibrosa foi considerada fina quando < que 150 µm e grossa quando > ou igual a 150 µm. No período de 7 dias o Sealapex causou mais necrose e calcificações. O MTA Fillapex em 15 dias apresentou reação moderada e semelhante àquela provocada pelo controle (apenas tubo) e pelo Sealapex. MTA Fillapex e MTA Ângelus causaram reações leves após o período de 15 dias. Após 30, 60 e 90 dias não houve diferença estatística entre os cimentos (reação inflamatória leve), com mais áreas de mineralização para o Sealapex. Observaram em todos os materiais a presença de mineralização birrefringente e granulação para a luz polarizada. Pelos seus resultados, o MTA Fillapex foi considerado um material biocompatível e estimulante de mineralização.

No estudo desenvolvido por Bin et al 2012, a citotoxicidade e a genotoxicidade do cimento MTA Fillapex foi avaliada em comparação ao MTA branco e ao AH Plus em cultura de fibroblastos de hamster chinês (V79) em contato com diferentes diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) e tempo de presa diferentes (12, 48 e 72 h). A citotoxicidade foi avaliada por (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) a fim de verificar a viabilidade e taxa de sobrevivência das células, e a genotoxicidade pelo ensaio de formação de micronúcleos, sendo que a taxa de sobrevivência celular e número de micronúcleos foram avaliadas

antes e depois da exposição ao extrato do cimento. Os cimentos foram manipulados conforme a instrução do fabricante, colocados em placas de 24 poços (16,2 mm de diâmetro, 2 mm de altura), incubados a 37 ° C durante 12, 48, ou 72 horas. Após esses períodos, adicionaram 2,5 ml de meio de cultura, e incubaram no escuro, durante 24 horas a 37 ° C. Após a incubação, esses extratos (1:1) foram diluídos em série. As células foram semeadas a 5×10^3 células / poço em placas de 96 poços, incubadas durante 24 horas a 37 ° C, estimuladas com 200 mL dos extratos. Após 24 horas realizou o ensaio de MTT espectrofotômetro a 570 nm, e em seus resultados encontraram que o MTA branco manteve a taxa de viabilidade celular superior a 70% para todas as diluições e períodos avaliados. O AH Plus foi citotóxico nas diluições de 1:1, 1:2, e 1:4 (48 h), e o MTA Fillapex foi citotóxico nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4, e 1:8 (12 h), mostrando a maior citotoxicidade neste estudo. Na análise de formação de micronúcleos, o MTA branco foi o que mostrou os melhores resultados, estimulando a menores taxas de formação de micronúcleos, mesmo na maior diluição (1:1). O MTA Fillapex e o AH Plus (1:4 às 48 horas) estimularam a formação de micronúcleos 8 vezes em comparação com o grupo controle sem tratamento. O MTA branco foi considerado o menos citotóxico e genotóxico, sendo o MTA Fillapex o mais citotóxico, sendo atribuído à presença do composto resinoso, e o salicilato.

Scelza et al. 2012 em seu estudo *in vitro* com osteoblastos primários humanos avaliaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos Sealapex, Pulp Canal Sealer EWT, Real Seal e MTA Fillapex em dois períodos experimentais (1 e 7 dias após a manipulação). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio multiparamétrico, da atividade mitocondrial (XTT), da integridade da membrana (teste de vermelho neutro) e da densidade total de células (teste de exclusão do corante cristal de violeta). Cada cimento foi manipulado conforme a instrução do fabricante e os extratos dos cimentos preparados após 1 ou 7 dias após a manipulação de 0,1 g de cada cimento. Para as análises, os osteoblastos foram cultivados em placas de cultura de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço e expostos aos extratos por 24 h, a 37° C com 5% de CO₂. Um grupo foi exposto apenas ao meio de cultura (controle negativo). Em seus resultados para 24 horas, observaram que todos os cimentos tiveram fortes efeitos citotóxicos, uma vez que todos os extratos induziram taxa de sobrevivência de <20% do que o grupo de

controle. Para os extratos preparados 7 dias após a mistura, o Sealapex aumentou a sobrevivência celular, exceto para XTT, enquanto Pulp Canal Sealer EWT teve níveis de sobrevivência celular e integridade equivalentes a do grupo controle, sendo maior que os outros grupos em todos os parâmetros avaliados. O cimento Real Seal teve maior taxa de sobrevivência aos 7 dias do que MTA Fillapex e Sealapex em relação ao XTT. O tempo não influenciou na citotoxicidade do MTA Fillapex e Real Seal. Todos os cimentos endodônticos tiveram forte citotoxicidade 24 horas após a mistura, sendo que a viabilidade celular para o Sealapex foi significativamente aumentada no período de 7 dias. Houve uma correlação entre a citotoxicidade e o tempo após a mistura, sendo a citotoxicidade tempo-dependente, e todos os cimentos apresentaram altos níveis citotóxicos para células primárias humanas.

Marques et al. (2013) avaliaram histologicamente a resposta do tecido subcutâneo de rato frente aos cimentos MTA Fillapex, um experimental à base de cimento Portland e propilenoglicol, e ZOEI (à base de óxido de zinco e eugenol com iodofórmio) em dois períodos experimentais, 7 e 15 dias. Os materiais foram manipulados, inseridos em tubos de polietileno e implantados no dorso de ratos Wistar. Após os períodos experimentais os animais foram mortos, os tubos retirados juntamente com a pele e tecido conjunto ao seu redor, os espécimes corados com hematoxilina e eosina, e a resposta inflamatória na interface material-tecido na extremidade aberta do tubo foi analisada em microscópio óptico. Para análise do grau de inflamação utilizaram como critério número e tipo de células da seguinte forma: grau 0- sem células inflamatórias, 1- pequeno número de células inflamatórias (leve), 2- grande número de células inflamatórias, sem predomínio no campo microscópico (moderado), 3- células presentes como infiltrado, com predomínio no campo microscópico (intenso), 4- necrose. Os resultados obtidos mostraram que aos 7 dias todos os materiais causaram reações inflamatórias moderadas, tendo sua regressão com o tempo. Os espécimes do grupo ZOEI apresentaram grau 3 aos 7 dias, sendo a maior resposta inflamatória observada, e grau 2 aos 15 dias. O MTA Fillapex apresentou grau 3 com algumas células gigantes, macrófagos e linfócitos após 7 dias. Aos 15 dias, os espécimes apresentaram grau 2 com presença de fibroblastos e fibras colágenas, indicando processo cicatricial do tecido. O cimento Portland demonstrou grau 2 para o período de 7 dias, e aos 15 dias praticamente não havia reação inflamatória (grau 1), com

muitas fibras colágenas, indicando cicatrização normal do tecido. Diante dos resultados, concluíram que os cimentos MTA Fillapex e Portland são mais biocompatíveis do que a pasta de óxido de zinco e eugenol com iodofórmio.

Silva et al. (2013) analisaram a citotoxicidade dos cimentos MTA Fillapex e AH Plus em células Balb/c 3T3 pelo ensaio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) em 5 períodos diferentes. Os cimentos foram manipulados conforme as instruções do fabricante e colocados em discos de teflon (5 mm de diâmetro e 2 mm de altura). Os extratos foram feitos em meio de cultura celular e os frascos com os extratos agitados durante 24 horas em um banho de água a 37 °C. As células foram cultivadas em placas de 24 poços (1×10^5 células / poço), e após fixação durante a noite, as células foram tratadas com diversos extratos dos cimentos (500 µl / poço) durante um total de 4 semanas, sendo que a citotoxicidade foi avaliada por semana. Após esses períodos, as células receberam solução de succinato desidrogenase de MTT durante 4 horas. Os cristais de formazam produzidos dentro das células foram dissolvidos usando solução de isopropanol 10%NP40-0.4N HCl. Alíquotas de 100 µl da solução foram transferidas de cada poço para uma placa de 96 poços, e a viabilidade celular medida pela absorvância a 490 nm por meio do leitor de microplacas. Os resultados mostraram que o AH Plus foi moderadamente citotóxico quando fresco, levemente citotóxico após uma semana e não mais citotóxico depois de 2 semanas. O MTA Fillapex apresentou citotoxicidade severa durante todo o período experimental, não diminuindo ao longo do tempo, além disso, foi mais citotóxico que o AH Plus em todos os períodos experimentais ($P < 0,05$).

2.2.4 Sealepox (Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, Brasil)

É um cimento experimental que vem sendo desenvolvido na disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP) pelo Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes. No ano de 1984, Moraes deu início a sua pesquisa visando desenvolver um novo cimento baseado no AH26 (MORAES, 1984). Tem como precursores os cimentos MBLc e MBPc, do qual alguns componentes foram substituídos, no entanto, manteve as mesmas

características, propriedades físicas, indicações e apresentação na forma pasta/pasta (VIVAN et al., 2009).

Trata-se de um cimento à base de resina epóxi-amina, que contém hidróxido de cálcio em sua formulação, podendo ser utilizado como cimento endodôntico (Sealepox), no selamento de perfurações e como material retrobturador (Sealepox RP), diferindo apenas nas proporções utilizadas conferindo consistências adequadas para cada tipo. Apresenta-se na forma de duas pastas: pasta base: hidróxido de cálcio, tungstato de cálcio, fosfato de cálcio, resina epóxica Bisfenol A; pasta catalisadora: sulfato de bário, subnitrato de bismuto, endurecedor de resina epóxica, poliol de poliuretana vegetal (mamona).

Diversos estudos têm sido realizados com a intenção de avaliar as propriedades físico-químicas dos materiais endodônticos, no entanto, no que se refere às propriedades biológicas desse novo cimento, ainda tem um vazio a ser preenchido.

Cintra et al. (1996) estudaram a biocompatibilidade dos cimentos MBPc e MTA ProRoot por meio da análise qualitativa e quantitativa da resposta inflamatória e do potencial de formação óssea após implantação de tubos de polietileno preenchidos com esses cimentos em ratos Wistar em 3 períodos experimentais: 7, 15 e 30 dias. Para isso os animais foram divididos em 3 grupos: grupo 1 (controle) contendo apenas tubos de polietileno vazios, e grupos 2 e 3 contendo os cimentos MTA ProRoot e MBPc, respectivamente. Em seus resultados observaram que o MBPc desencadeou uma resposta inflamatória semelhante àquela provocada pelo MTA ProRoot. Nos 7 e 15 dias, o MBPc mostrou discreto infiltrado inflamatório contendo macrófagos e linfócitos no tecido conjuntivo, poucos fibroblastos jovens e vasos sanguíneos novos, além de linhas hialinas mais largas e grossas e áreas basofílicas menos organizadas. Aos 30 dias já havia formação óssea, no entanto, assim como nos outros grupos, essa formação não se apresentava concluída. Os autores concluíram que os materiais apresentaram comportamento biológico semelhante, com diferenças relacionadas ao tecido mineralizado.

No estudo de Orosco et al. (2008) foi avaliada a capacidade de selamento de tampões apicais confeccionados com MTA cinza Ângelus, CPM e MBPc em

canais radiculares de 98 dentes unirradiculados extraídos. Os dentes foram instrumentados até a lima tipo K 90 e as raízes divididas em 3 grupos experimentais com 30 dentes cada, onde cada grupo recebeu tampão apical de 5 mm do seu referido cimento, e dois grupos controles com 4 dentes cada, que não receberam tampão apical, e a obturação foi finalizada pela técnica da condensação lateral ativa. A porção apical foi corada com solução de Rodamina B a 0,2% e a capacidade de vedação foi avaliada medindo-se a infiltração de corante. Os dados obtidos revelaram que a capacidade de vedação pode ser classificada, em ordem decrescente, da seguinte maneira: MBPc, MTA Ângelus cinza e CPM. O teste de Dunn mostrou ser o MBPc significativamente melhor que os outros materiais aqui testados.

Vivan et al. (2009) avaliaram a radiopacidade de 5 materiais de preenchimento apical (MTA branco Ângelus, MTA Bio, MTA fotopolimerizado, Sealepox RP, clínquer de cimento Portland com 20% de óxido de bismuto e sulfato de cálcio). Os cimentos foram manipulados conforme as instruções do fabricante vertendo os cimentos em anéis metálicos de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (ISO 6876:2001). Como grupo controle foram confeccionados cilindros de dentina de 1mm de espessura a partir de raízes de dentes humanos recém extraídos. Após tomar presa, as amostras foram radiografadas com filme oclusal Insignth e o valor da radiopacidade determinado de acordo com a densidade radiográfica, sendo convertida em milímetros de alumínio (mm Al). Seus resultados mostraram que o MTA Ângelus apresentou maior radiopacidade, seguido pelo Sealepox RP. O clínquer de cimento Portland e MTA apresentaram valores semelhantes, assim como a dentina e o MTA fotopolimerizado, sendo que este apresentou o menor valor de radiopacidade. Todos os cimentos, exceto o MTA fotopolimerizado, demonstraram estar dentro das especificações da ISO 6876:2001.

Miranda, Fidel e Boller (2009) a fim de avaliar a citotoxicidade do MBPc, MTA Branco Ângelus e ProRoot MTA cinza, realizaram um estudo *in vitro* com cultura de células L929 usando o método de camada de ágar com o corante vermelho neutro. Teflon e borracha natural serviram de controles negativos e positivos. Os valores médios obtidos foram comparados e convertidos em graus de modo a classificar os resultados de acordo com a tabela de tipos de citotoxicidade de acordo com a Norma de Procedimentos Operacionais da Fundação Oswaldo

Cruz, Brasil. Os resultados mostraram que os dois tipos de MTA desencadearam citotoxicidade grau 1 (ligeira citotoxicidade), enquanto que o MBPc apresentou grau 2 (leve). No entanto, todas as amostras foram consideradas satisfatórias, pois nenhuma das culturas mostraram reatividade superior ao grau 2.

2.3 METODOLOGIA

Na literatura encontra-se diversos métodos para analisar as propriedades dos materiais odontológicos. A avaliação das propriedades biológicas está embasada em três níveis de testes: 1º nível: teste *in vitro* da toxicidade por meio de culturas de células; 2º nível: teste em animais para avaliar a resposta do tecido ou osso do hospedeiro; 3º nível: teste a partir da simulação da prática clínica, sendo conhecido como teste de utilização (TRONSTAD; WENNERBERG, 1980).

2.3.1 Cultura Celular

Uma vez que é fundamental a utilização de materiais biocompatíveis para não causar agressão tecidual e promover o reparo, diversas metodologias têm sido utilizadas com o intuito de analisar o comportamento biológico dos materiais obturadores no tecido conjuntivo periapical. Os métodos histopatológicos, como estudos *in vivo* com tubos de teflon implantados no subcutâneo de rato são bastante difundidos na literatura. No entanto, seus resultados são de difíceis comparações devido à natureza subjetiva e qualitativa das técnicas histopatológicas (NAKAMURA et al., 1986).

Em 1997, Junqueira e Carneiro afirmaram que estudos *in vitro* proporcionam as condições necessárias para a análise do metabolismo e do comportamento celular em contato com os diferentes materiais obturadores.

Apesar da variedade de métodos utilizados para avaliar a citotoxicidade de biomateriais, a utilização de ensaios de cultura celular é bem aceito, baseado bioquimicamente, e frequentemente utilizado como método inicial (HANKS; WATAHA; SUN, 1996).

A utilização de culturas de células para a avaliação da toxicidade dos materiais dentários, desde que as condições experimentais simulem o *in vivo*, e respeitem suas limitações, são ferramentas preciosas para entender seu comportamento biológico (POLYZOIS, 1994).

Os materiais obturadores quando em contato com os tecidos periapicais ocasionam agressão às células, que liberam mediadores químicos. Esse stress celular promove alterações morfofuncionais e até mesmo a morte celular. Em decorrência disso, a liberação de mediadores químicos ajuda a avaliar a citotoxicidade dos materiais, uma vez que, quanto maior a liberação, maior é a agressão (LEONARDO et al., 1997).

2.3.2 Reação de Griess

Para determinar a quantificação de nitrito, a reação de Griess é o método oficial que envolve procedimentos espectrofotométricos. O nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido gerando o diazo, o qual reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED) gerando um composto de coloração vermelha intensa, sendo que a reação é dependente do tempo e o produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h após a mistura dos reagentes.

Queiroz et al. (2005) avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos endodônticos, o Sealer 26 à base de resina epóxi, e o Endofill, que contém óxido de zinco e eugenol pela produção induzida de óxido nítrico sobre macrófagos peritoneais de ratos Swiss. Os cimentos foram manipulados de acordo com as normas do fabricante e depois de tomados presa foram pulverizados e realizadas suspensões dos mesmos na concentração de 18mg/ml. Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^6 célula/ml e estimulados com 100µL da suspensão na presença ou ausência de LPS (controle negativo). Após 48 horas de cultura, o óxido nítrico foi dosado por meio da reação de Griess. Para isso, alíquotas de 50 µL do poço foram transferidas para outra placa de 96 poços, 50µL do reagente de Griess foi adicionado e após 10 min dosou-se a produção de óxido nítrico usando o leitor de ELISA na densidade óptica de 540nm. Os autores encontraram que o cimento Sealer 26 induziu a maior liberação de NO (média de 143.82µmols), não havendo diferença significativa com o grupo controle

positivo. A produção média de NO pelos macrófagos estimulados com o Endoffil foi de 80.33µmols. A taxa média de produção de NO para o controle positivo e negativo foi 162.75µmols e 42µmols, respectivamente. Dessa forma, o cimento Sealer 26 causou, significativamente, maior citotoxicidade para os macrófagos, e isso se deve aos componentes da resina epóxi e pela liberação de formaldeído na sua reação de polimerização.

Da Silva et al. 2008 avaliaram em macrófagos peritoniais de ratos Swiss a citotoxicidade dos cimentos Topseal, EndoREZ, TubliSeal e Kerr Pulp Canal Sealer EWT pela formação de reativos de oxigênio e nitrogênio. Os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e suspensões preparadas com polietilenoglicol 400 nas concentrações de 9 mg/mL e 18 mg/mL. Para a análise do peróxido de hidrogênio, 100µl da suspensão contendo os macrófagos (2×10^6 cél/ml) foram colocados nos poços da placa de cultura de 96 poços e expostas a 50 µl de peroxidase de rábano (HRP) e após 1h a reação foi interrompida com 10 µL de NaOH 4N. Para dosar os níveis de óxido nítrico, 5×10^6 células + 100µl da solução foram colocadas nos poços de placa de cultura de 96 poços e incubadas por 24h 37° C em 5% de CO₂ ambiente. Em seguida, 50µl do sobrenadante foi adicionado a 50 µl do reagente de Griess e depois de 10 min. fez-se à leitura com uma absorvância de 540 nm em leitor de microplacas (Leitor de Elisa). Os resultados da produção de peróxido de hidrogênio foram semelhantes para as duas concentrações dos cimentos: Topseal > controle positivo (células + 5mg/mL de zimozan) > EndoREZ > TubliSeal > Kerr Pulp EWT > controle negativo (apenas células). Para o óxido nítrico, as concentrações produziram resultados diferentes, sendo eles: 9 mg/ mL - controle positivo (células + 10 µg/mL de LPS) > Topseal > Kerr Pulp EWT > TubliSeal > EndoREZ => controle negativo (apenas células), e para 18 mg/mL: controle positivo > Topseal > Kerr Pulp EWT > TubliSeal > EndoREZ > controle negativo. O cimento Topseal foi o mais citotóxico entre os cimentos testados, liberando as mais altas concentrações de NO e H₂O₂ em cultura de macrófagos, e este resultado pode ser devido a quantidades mínimas de formaldeído existente na sua formulação ou à liberação da amina e componentes de resina epoxi a partir deste material.

2.3.3 Citometria de Fluxo

Atualmente existem diversas maneiras de analisar, detectar e quantificar a morte celular por apoptose. Na sua maioria detectam alterações morfológicas nucleares, como diminuição de tamanho, condensação da cromatina e a fragmentação do DNA.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma das formas de análise da apoptose. É uma técnica conceitualmente simples de análise de ácidos nucleicos que foi desenvolvida em 1985 por Kary Mullis (SAIKI et al., 1988). Está baseada na amplificação *in vitro* de sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), em que se utiliza apenas de uma característica físico-química do DNA, o seu comportamento quando exposto a diferentes temperaturas (MANFRO; BARROS; SAITOVITCH, 1999; PASSAGLIA; ZAHA, 1996). Na reação, a enzima polimerase é direcionada a sintetizar uma região específica do DNA, resultando à amplificação da mesma, não havendo necessidade de isolamento dessa região, uma vez que esta é definida pelo primers ou iniciadores utilizados na reação.

Outra forma de analisar a apoptose é por meio da citometria de fluxo. Esta técnica analisa a fragmentação do DNA e alguns marcadores de membranas pela utilização de corantes fluorescentes (BAUER; DUQUE; SHANKEY, 1993). O citômetro, um equipamento ótico e hidráulico, analisa estas células marcadas pela aspiração das células em meio líquido. As células atravessam a câmara de fluxo, onde há incidência de laser sobre uma a uma e dispersão da luz quer na direção frontal (forward scattering), quer lateral (side scattering), permitindo a identificação das células pelo seu tamanho e granularidade interna. Essa dispersão é detectada por um conjunto ótico que diferencia o ângulo (frontal: que analisa o volume da célula; lateral: analisa complexidade citoplasmática) e a cor gerada pelo fluorocromo fixado à estrutura da célula. Devido o fluorocromo possuir um padrão espectral distinto de absorção e emissão, até três cores de luz podem ser opticamente separadas com os filtros existentes nos citômetros comuns. Os fótons de luz são convertidos em impulsos elétricos, os quais por sua vez são convertidos em sinais digitais para análise dos resultados, que são oferecidas em diferentes formas, tais como histogramas, dot-plot, tabelas entre outros. (BRAGADA, 2008; FLEURY)

O citômetro de fluxo é composto por 5 partes, sendo elas: um fluxo de células; fonte de luz (lâmpada de mercúrio ou laser); um detector e conversor de sistema analógico para digital (ADC) - gerando parâmetros de tamanho e complexidade, assim como sinais fluorescentes; um sistema de amplificação; e um computador para análise de sinais.

O corante Iodeto de Propídeo (PI) é um marcador nuclear fluorescente que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável, pois, por ter elevado peso molecular, não penetra na célula intacta devido ao seu tamanho (MACKLIS; MADISON, 1990). Também não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Dessa forma, é usado para distinguir células viáveis das não viáveis, uma vez que não ocorre interação do PI com a membrana das células viáveis, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo PI.

Quando se associa Anexina V-FITC (fluorescência verde) com o corante PI (fluorescência vermelha) é possível diferenciar as células intactas (FITC - PI -), no início da apoptose (FITC+ PI -), e no estágio final da apoptose, em necrose ou mortas (FITC+ PI+).

2.3.4 ELISA

O termo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) significa ensaio imunoenzimático, e essa técnica foi desenvolvida por Engvall & Perlman e por van Weeman & Schuurse (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

É uma técnica importante para avaliações imunológicas e bioquímicas, sendo muito utilizado como diagnóstico em várias doenças. É aplicado para a detecção de anticorpos em uma variedade de substâncias biológicas, e uma vez que é específico para imunoglobulina de ligação, mede diretamente a quantidade de anticorpo capaz de reagir com um antígeno específico, não existindo a possibilidade de interferência por meio de material de ligação não imunoglobulina, e uma vez ocorrida à interação antígeno-anticorpo ocorre uma mudança de coloração, a qual é mensurada por um espectrofotômetro (Leitores de Elisa) por meio das medidas de

densidade óptica ou intensidade de fluorescência. Possui a vantagem de proporcionar uma medição que é tão sensível como a do radioimunoensaio sem os riscos dos materiais radioativos, além de ser mais rápido e barato (LOIZOU et al., 1985).

Diversas doenças infecciosas podem ser diagnosticadas pelo ELISA, pois a maioria dos patógenos desencadeia uma reação imune com produção de imunoglobulinas. Além disso, também pode ser usado no diagnóstico de doenças auto-imunes ou alergias (SIMERSKY et al., 2007).

Existem diferentes modelos de teste de Elisa, o método indireto, direto ou sanduiche, e o competitivo. Na modalidade indireta há detecção de anticorpos, sendo que para isso o antígeno é plaqueado ficando aderido aos poços da microplaca (96 poços), em seguida coloca-se sobre este as amostras em teste, e havendo antígeno nas amostras ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo, a qual será detectada pela adição do segundo anticorpo (humano-IgG) ligado à enzima peroxidase, denominados como conjugado. Ao adicionar o substrato cromógeno ocorrerá mudança na coloração nos poços onde houve interação antígeno-anticorpo. O método direto ou sanduíche é indicado para a detecção de antígenos e é assim denominado pelo fato do antígeno ficar entre dois anticorpos. Inicialmente coloca-se o anticorpo primário ou de captura, em seguida a amostra e depois o anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase, a qual reage com o substrato cromógeno alterando a coloração do poço que apresenta o antígeno em questão, sendo que a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. O método competitivo é mais usado para detectar antígenos, no entanto, também pode ser utilizado para identificar anticorpos. Nessa técnica, primeiramente o anticorpo é adsorvido no fundo do poço para em seguida adicionar a amostra que contém possivelmente o antígeno e depois adicionado o anticorpo conjugado à enzima, e não havendo alteração da cor significa que não há antígenos aderidos aos anticorpos. Para mensurar a quantidade de antígenos nas amostras, é necessário lançar mão de uma curva padrão, para isso fazem-se diluições seriadas a partir do antígeno de concentração conhecida (ARAUJO, 2013).

Martin et al. (2006) analisaram as concentrações de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13) e moléculas co-estimulatórias pela técnica do Elisa por meio do plasma de indivíduos saudáveis, sendo que a maioria das interleucinas, ao contrário dos seus receptores, não são detectados nos fluidos corporais de indivíduos saudáveis. Para isso, trinta doadores saudáveis foram selecionados e incluídos na análise (15 mulheres e 15 homens) com idade média de 34 anos. O plasma foi obtido por centrifugação (250 g/10 min) e armazenado a -80° C, para posterior análise por ELISA (ensaio imunoenzimático). Foi analisada a correlação entre as citocinas e moléculas co-estimuladoras (IL-2, IL-13, TNF- α , sIL-6-R, sCD23, sCD40L, e TGF-p1) e o coeficiente de correlação de Spearman foi calculado. Os resultados obtidos foram expressos em concentrações e a mediana, sendo eles: IL-2 (0-74,48 pg/mL; 0), IL-4 (0-65,18 pg/ml, 0), a IL-5 (0-86,69 pg/mL; 0), IL-6 (0 - 73,17 pg/mL, 0), a IL-8 (0-74.8pg/mL;0), a IL-10 (0-12,6 pg/ml, 0), a IL-13 (0-3,9 pg/ml; 0), sCD40L (0-3.5ng/mL; 0), e TNF- α (0 - 67,6; 0). Para o receptor da IL-6, a concentração foi $75,89 \pm 35,83$ ng/ml (média $\pm$ DP), sCD23 $28,9 \pm 15,22$ ng/ml, TGF-p1 e $14,98 \pm 12,39$ ng/mL. De acordo com os autores, os resultados obtidos fornecem valores de referência para os níveis de citocinas no plasma de indivíduos saudáveis (MARTIN et al., 2006).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e Sealepox RP sobre os neutrófilos PMNs, determinando-se:

1. A taxa de produção da quimiocina CXCL8;
2. A viabilidade dessas células através da taxa de apoptose celular;
3. 3. A produção de Óxido Nítrico (NO) pelos neutrófilos

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cimentos Endodônticos:

Os cimentos analisados foram o AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e o Sealepox (Figura 3).

Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.1.1 AH Plus (Dentsply/ De Trey, Konstanz, Alemanha):

O cimento é apresentado em forma de pasta/pasta, uma a base e outra a catalisadora com a seguinte formulação: resinas epóxicas, óxido de zircônio, óxido de ferro, tungstato de cálcio e óleo de silicone. Partes iguais (6 cm) de pasta base e pasta catalisadora foram colocadas sobre uma placa de vidro e misturadas com o auxílio de uma espátula 24F até se obter uma consistência homogênea.

4.1.2 Sealapex (SybronEndo, Michigan, EUA):

O cimento se apresenta na forma de pasta/pasta, uma base e outra catalisadora com a seguinte formulação: óxido de cálcio, trióxido de bismuto, óxido de zinco, sílica sub-micron, estearato de zinco, dióxido de titânio, fosfato tricálcico; mistura, etil tolueno sulfonamida, poli (metileno salicilato de metil), resina isobutil salicilato. Colocaram-se partes iguais das pastas (6 cm cada) sobre uma placa de vidro e misturado com auxílio de uma espátula 24F até se obter uma consistência homogênea.

4.1.3 MTA Fillapex (Ângelus, Londrina, PR, Brasil):

O cimento apresenta-se na forma de pasta/pasta, uma base e outra catalisadora em seringa munida de ponta misturadora. Sua composição, segundo o

fabricante é: salicilato de resina, resina diluída, resina natural, trióxido de bismuto, sílica nanoparticulada, MTA e pigmentos. Foi dispensado, sobre uma placa de vidro, 6 cm do cimento que foram manipulados até se obter uma consistência homogênea.

4.1.4 Sealepox (Desenvolvido na disciplina de endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, Brasil):

O cimento se apresenta em forma de pasta/pasta, sendo uma base e outra catalisadora. É composto por hidróxido de cálcio, tungstato de cálcio, fosfato de cálcio, resina epóxica Bisfenol A, sulfato de bário, subnitrato de bismuto, endurecedor de resina epóxica, poliol de poliuretana vegetal (mamona). Para a manipulação foi utilizada a proporção de 2:1, base e catalisadora, respectivamente.

Figura 2: Cimentos Endodônticos. (A) AH Plus. (B) Sealapex. (C) MTA. (D) Sealepox.

4.2 Para a obtenção do extrato dos cimentos:

Os cimentos foram preparados em condições assépticas para evitar contaminação biológica durante os experimentos. Para isso, todo o material (espátula e placa de vidro) utilizado para a manipulação dos cimentos passou, previamente, por um processo de queima, que foi realizado em estufa a 170°C por 60 minutos objetivando inativar a endotoxina (LPS), e a manipulação realizada dentro da capela de fluxo laminar.

Os cimentos imediatamente após a mistura foram colocados em placas de cultura de 24 poços (16,2mm de diâmetro, 2mm de altura) e incubadas a 37° C durante 2 períodos, um de 24 horas e outro de 48 horas (BIN et al., 2012).

Passados esses períodos, as amostras foram cobertas com 2,5 mL de meio de cultura RPMI 10%SFB (Gibco/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,CA, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina (Gibco/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,CA, EUA), e levadas à incubadora (Thermo Eletron Corporation – Forma Series II) onde permaneceram no escuro durante 24 horas a 37° C (figura 3). Após a incubação, os extratos originais foram diluídos a de 1:1, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 em meio de cultura RPMI 10% SFB (Figura 4). A partir dessas concentrações, foram realizados os estímulos das culturas com 100µL do substrato, na presença ou ausência de LPS, e as análises propostas no projeto.

Figura 3: Manipulação dos cimentos endodônticos. **(A)** Poços com os cimentos manipulados (AH Plus, MTA Fillapex, Sealapex e Sealepox). **(B)** 2,5mL de RPMI 10% SBF.

Figura 4: Solução dos Cimentos diluídos em RPMI 10% SBF nas diluições de 1:1, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.

4.3 Isolamento e cultura de neutrófilos humanos

Os indivíduos selecionados para este estudo foram aqueles que procuraram o laboratório de análises clínicas do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofacial, HRAC-USP para a doação voluntária de sangue. Todos foram informados sobre o caráter da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, respeitando a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os critérios de inclusão compreenderam: indivíduos sadios ($n=14$) entre 15 e 65 anos e ausência de fatores locais e sistêmicos que favoreceriam alterações com a função de neutrófilos (ex. uso de medicamentos).

Coletou-se 10 mL de sangue periférico humano em seringa estéril heparinizada, o qual foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e adicionado 2 mL de meio RPMI 10% SFB. Seis mL de sangue foi aplicado nos tubos de 15 mL contendo 4 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO, USA) e 3 mL de Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO, USA). Após centrifugação a $460 \times g$ / 29 min / 25°C , as células do sangue foram separadas e a segunda camada de células, contendo os PMNs neutrófilos, foi aspirada e lavada duas vezes em meio RPMI 1640 gelado a $500 \times g$ / 10 min / 4°C . Quando necessário procedeu-se a lise das hemácias utilizando 3 mL de NaCl 0,2% agitação por 30 segundos, adição de 11 mL de RPMI 10% SFB e centrifugação a $500 \times g$ / 10 min / 4°C . O sobrenadante foi

descartado e adicionado às células 1mL de RPMI 10% SFB. Determinou-se o número de neutrófilos após a coloração de Turk (5µL de células + 495µL de Turk) e contagem. As células foram semeadas na concentração de 1×10^6 /mL em cada poço de placa de cultura de 24 poços.

As células foram cultivadas com os extratos dos cimentos (100µL) nas diferentes concentrações e tempo de presa, na presença ou ausência de 1µL de LPS (10 ng/mL). Poços contendo apenas meio (controle negativo), e meio mais LPS (controle positivo) também foram feitos.

4.4 Tratamento das amostras

Após 24 horas de cultura, o conteúdo de cada poço da placa de cultura foi obtido e centrifugado por 300 X g/ 10 min/ 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi coletado, armazenado em microtubos devidamente identificados e congelado a -80°C para futuras dosagens de CXCL8 e Óxido Nítrico. O pellet contendo as células de cada amostra foi utilizado imediatamente para a análise da viabilidade celular (apoptose).

4.5 Análise da viabilidade celular

As células foram obtidas após 24 horas de cultivo e suspensas em 100 uL de RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) . Cada amostra recebeu 1 µL de iodeto de propídeo (Aposcreen Annexin V-FITC, R&D Systems, Minneapolis, USA) e foi mantida por 10 min/ 4°C no escuro. Em seguida adicionou-se 2 mL de RPMI 1640 e centrifugou-se a 350 x g/10 min/ 4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionados às células 200µL de RPMI 1640 e as amostras analisadas por citometria de fluxo por meio do Citômetro de Fluxo Becton-Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) (Figura 6). Para a análise dos resultados foi utilizado o software Flowjo (Tree Star, Inc – Ashland, OR, EUA) (Figura 5).

Figura 5: Análise da apoptose. **(A)** Citômetro de Fluxo Becton-Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA , EUA). **(B)** Software Flowjo (Tree Star, Inc – Ashland, OR, EUA).

4.6 Dosagem de CXCL8

A quimiocina CXCL8 foi dosada por meio do ensaio “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA sanduíche) (Kit OPTSEia, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As placas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpo de captura (100µL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH=9,4) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween 20 (BD Biosciences) e feito o bloqueio com PBS Molico® 5% (BD Biosciences) por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e as amostras e citocinas recombinantes colocadas nos poços. Após incubação por 2 horas a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 e distribuídos o anticorpo biotilado diluído com PBS 10% SFB (BD Biosciences). Após incubação de 1 hora a temperatura ambiente, as placas foram lavadas e colocado o conjugado avidinaperoxidase diluído em PBS 10% SFB, mantido por 1 hora a temperatura ambiente.

As placas foram lavadas, colocado o substrato (peróxido de hidrogênio) e o acceptor de elétrons tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences). Após 40 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N. A determinação das concentrações da quimiocina CXCL8 foi realizada pela análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro com filtro de 450nm (Bio-Rad, EUA).

4.7 Avaliação da produção de Óxido Nítrico

A produção de NO foi avaliada em sobrenadantes de culturas de células. Para tal mensurou-se a produção de NO₂ (nitrito) nos sobrenadantes das culturas pela reação colorimétrica de Griess. Para isso utilizou-se placa de cultura de 96 poços.

Em cada poço foi colocado 50 µL do sobrenadante das culturas e adicionados 50 µL de reagente de Griess (50 µL de NEED 0,1% e 50 µL de Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e incubados por 10 minutos a 26°C. Em seguida, determinou-se a absorbância (filtro de 530 nm) em espectrofotômetro (Bio-Rad, EUA).

Os resultados expressos em hmoles foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM).

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, pelos testes de Anova a dois critérios seguido de Tukey. Todas as médias dos dados ± erros padrões das médias foram comparados entre si e em relação aos grupos controles não estimulados e os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Cimentos endodônticos interferem na viabilidade de neutrófilos humanos.

Neutrófilos cultivados apenas com meio apresentam baixa percentagem de morte celular (19,30%) (Gráfico 1). No entanto, a estimulação com LPS aumentou a taxa de morte dos neutrófilos humanos (30,81%), mas não significativamente (Gráfico 1).

5.1.1 AH Plus 24 e 48 horas

A estimulação com o cimento AH Plus/24horas na diluição de 1:4 acarretou em menor taxa de morte celular (9,80%), sendo que a diluição de 1:16 foi a que apresentou a maior percentagem (23,70), sendo esse aumento não estatisticamente significativo quando comparado aos neutrófilos cultivados apenas com meio (19,30%). As demais concentrações (1:8, 1:1 e 1:32) não induziram alterações significativas na viabilidade de neutrófilos. Cimento endodôntico AH PLUS/24h (1:1 e 1:4) em cultura de neutrófilos estimulados com LPS foram os que apresentaram menor morte (24,40% e 23,06%, respectivamente), sendo esta a menor entre todas as diluições. AH PLUS nas demais concentrações apresentaram maior percentagem de morte de neutrófilos (Gráfico 1), no entanto, não foi estatisticamente significativo.

A estimulação de neutrófilos por 48 horas com AH Plus não alterou de modo significativo a viabilidade de neutrófilos (Gráfico 2). A baixa percentagem de morte celular pode ser percebida em todas as diluições. A maior taxa de morte celular foi observada nas culturas de neutrófilos estimulados com AH Plus na diluição de 1:1 (18,96%).

A adição AH PLUS (1:32) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu um leve aumento na percentagem de células mortas (39,32%), As outras diluições testadas do cimento não induziram alterações significativas na viabilidade de neutrófilos cultivados com LPS (Gráfico 2).

Gráfico 1. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 2. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.1.2 Sealapex 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com o cimento Sealapex/24h, em todas as diluições, não induziu alterações significativas na viabilidade de neutrófilos quando comparada às células estimuladas apenas com meio (19,30%) (Gráfico 3). A diluição de 1:32 induziu a menor taxa de morte celular (12,06%). A maior taxa foi induzida na diluição de 1:1 (17,74%), mesmo assim foi menor que a dos neutrófilos estimulados apenas com meio. A adição do Sealapex/24h (1:4, 1:32 e 1:8) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS diminuiu a taxa de morte celular (22,17%, 18,96% e 18,13%, respectivamente), e, na concentração de 1:1, induziu um aumento da morte de neutrófilos (32,09%) (Gráfico 3). O Sealapex/24h na diluição de 1:16 foi a que mais afetou a viabilidade dos neutrófilos, apresentando a maior percentagem de morte celular (45,38%), não sendo estatisticamente significativa.

A estimulação de neutrófilos por 48 horas com Sealapex não alterou de modo significativo a viabilidade de neutrófilos, exceto para a concentração de 1:32 que mostrou significativamente menor taxa de morte dos neutrófilos (8,74%) (Gráfico 4). A maior percentagem de morte celular foi observada após estímulo com o cimento na diluição de 1:16 (26,55%). A adição do Sealapex/48h na diluição de 1:32 à cultura de neutrófilos estimulados com LPS mostrou significativamente menor percentagem de morte celular (10,35%) em relação aos neutrófilos cultivados com somente meio (30,81%) (Gráfico 4). As demais diluições testadas do cimento não induziram alterações significativas na viabilidade de neutrófilos cultivados com LPS.

Gráfico 3. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário (n = 14) testado individualmente.

Gráfico 4. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário (n = 14) testado individualmente.

5.1.3 MTA Fillapex 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com MTA Fillapex/24h na diluição de 1:1 diminuiu significativamente a percentagem de morte celular (6,78%) ao se comparar com a taxa encontrada para os neutrófilos cultivados apenas com meio (19,31%) (Gráfico 5). As concentrações 1:8 e 1:32 também diminuíram a taxa de morte celular. As demais concentrações (1:4 e 1:16) não induziram alterações. A adição do cimento endodôntico MTA Fillapex/24h (1:1) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu significativamente menor percentagem de morte celular (7,27%) (Gráfico 5). As diluições de 1:4, 1:8 e 1:32 também induziram menor morte, quando comparado aos neutrófilos estimulados com LPS. MTA Fillapex/24h na diluição de 1:16 induziu a maior percentagem de morte celular (36,04%).

A estimulação de neutrófilos por 48 horas com MTA Fillapex (1:32) induziu a menor taxa de morte celular (8,94%), sendo essa diminuição estatisticamente significativa quando comparado aos neutrófilos cultivados apenas com meio (19,30%) (Gráfico 6). As demais concentrações não alteraram a viabilidade celular. A adição do cimento endodôntico MTA Fillapex/48h (1:16) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS aumentou a taxa de morte celular, sendo esta a maior entre todas (56,08%) (Gráfico 6). As concentrações 1:32 e 1:1 diminuíram significativamente a morte celular (14,16% e 3,81%, respectivamente), sendo esta a menor entre todas as concentrações, quando comparado ao LPS. As diluições de 1:4 e 1:8 não alteraram a viabilidade celular.

Gráfico 5. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 6. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 48h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.1.4 Sealepox 24 e 48 horas

A estimulação com o cimento Sealepox/24h na diluição de 1:16 (6,59%) induziu a menor taxa de morte celular, apresentando uma redução estatisticamente significativa quando comparado aos neutrófilos cultivados apenas com meio (19,30%) (Gráfico 7). A adição do cimento endodôntico Sealepox /24h (1:32) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu de modo significativo a menor percentagem de morte celular (11,12%), quando comparado aos neutrófilos estimulados apenas com LPS. Já a diluição de 1:16 induziu a maior taxa de morte celular (26,08%) entre todas as diluições (Gráfico 7). A baixa percentagem de morte celular pode ser percebida na diluição de 1:1.

A estimulação de neutrófilos por 48 horas com o Sealepox na diluição 1:32 reduziu significativamente a taxa de morte celular (3,38%) quando comparada com as células cultivadas apenas com meio (19,31%) (Gráfico 8). As diluições 1:1 (17,42%) e 1:8 (16,20%) não alteraram a viabilidade de neutrófilos. A estimulação dos neutrófilos com os cimentos nas concentrações 1:4 e 1:16 induziram uma leve diminuição na percentagem de morte celular, quando comparado aos neutrófilos estimulados apenas com meio. A adição do Sealepox/48h à cultura de neutrófilos estimulados com LPS alterou a viabilidade de neutrófilos (Gráfico 8). A diluição de 1:16 (48,81%) aumentou a morte celular, a qual foi a maior taxa observada entre todas as concentrações e nos neutrófilos estimulados com meio e LPS. Sealepox/48h 1:32 acarretou em uma acentuada diminuição da percentagem de morte celular (16,90%), mas não de modo significante. A estimulação nas concentrações de 1:1, 1:4 não induziram alterações na viabilidade dos neutrófilos, enquanto que 1:8 aumentou ligeiramente a morte celular (Gráfico 8).

Gráfico 7. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 24h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 8. Viabilidade dos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 48h na presença ou ausência de LPS. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM para cada voluntário ($n = 14$) testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.2 Cimentos endodônticos interferem na produção de CXCL8 por neutrófilos humanos.

Neutrófilos humanos cultivados apenas com meio produziram baixos níveis de CXCL8 (Gráfico 9). No entanto, ao estimulá-los com LPS, estes interferiram significativamente na produção desta citocina.

5.2.1 AH Plus 24 e 48 horas

Ao estimular os neutrófilos com o AH Plus/24h não houve alteração significativa na produção de CXCL8 pelos neutrófilos quando comparada as células estimuladas apenas com meio (Gráfico 9). Quando da estimulação na diluição de 1:16 ocorreu a maior taxa de produção de CXCL8 (28,4 pg/mL), e a menor na diluição de 1:32 (11,17 pg/mL). A adição do cimento endodôntico AH PLUS/24h à cultura de neutrófilos estimulados com LPS não induziu alterações na síntese de CXCL8, quando comparado aquela produção pelos neutrófilos estimulados apenas com LPS (Gráfico 9). A maior produção foi detectada nas culturas de neutrófilos estimulados na diluição de 1:4 (145,26 pg/mL) e a menor na 1:16 (136,01 pg/mL).

A estimulação com o AH Plus/48h não alterou a produção da CXCL8 (Gráfico 10) pelos neutrófilos quando comparada aquelas estimuladas apenas com meio. As diluições 1:16 e 1:32 induziram, respectivamente, a maior (31,61 pg/mL) e a menor (12,97 pg/mL) produção da mesma. As demais concentrações (1:1, 1:4, 1:8) não induziram alterações, mantendo a taxa semelhante daquela apenas com meio (20,46%). A adição do AH Plus/48h às culturas de neutrófilos não alterou os níveis dessa quimiocina quando comparado aos neutrófilos cultivados apenas com meio+LPS (Gráfico 10). A concentração 1:32 induziu um leve aumento dessa produção (148,21 pg/mL).

Gráfico 9. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 10. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.2.2 Sealapex 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com o Sealapex/24h (1:4 e 1:32) diminuiu a síntese de CXCL8 (18,60pg/mL e 7,73 pg/mL, respectivamente), sendo esta a menor entre todas as diluições, quando comparadas aquela produzida pelos neutrófilos estimulados apenas com meio (20,46 pg/mL) (Gráfico 11). Entretanto, as diluições 1:1 e 1:16 aumentaram os níveis de CXCL8 (32,30 pg/mL e 35,13 pg/mL), sendo esse último o maior. A adição do cimento endodôntico Sealapex/24 à cultura de neutrófilos estimulados com LPS não induziu alterações significativas na síntese de CXCL8 (Gráfico 11). A diluição 1:4 induziu a maior produção dessa quimiocina (144,83pg/mL), sendo que a menor foi na estimulação com 1:16 (126,33pg/mL (Gráfico 11).

A estimulação com o Sealapex/48h nas diluições de 1:4, 1:8 e 1:32 diminuíram a produção de CXCL8 em relação àquela produzida pelos neutrófilos estimulados apenas com meio (20,46 pg/mL) (Gráfico 12), sendo esta última (9,66pg/mL) a menor entre todas as diluições e estatisticamente significativa. As concentrações 1:1 e 1:16 não induziram alterações na síntese. A adição do Sealapex/48h às culturas de neutrófilos estimulados com LPS não alterou a produção de CXCL8 em relação aos neutrófilos cultivados apenas com LPS (128,75 pg/mL), sendo que a maior produção se deu nos neutrófilos estimulados com a diluição de 1:32 (152,00pg/mL) (Gráfico 12).

Gráfico 11. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle.

Gráfico 12. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.2.3 MTA Fillapex 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com o cimento MTA Fillapex/24h interferiu na produção de CXCL8 (Gráfico 13). As diluições 1:4 e 1:8 aumentaram significativamente a sua produção (53,77 pg/mL e 55,79 pg/mL, respectivamente) em relação aos neutrófilos cultivados com meio (20,46 pg/mL), sendo esta a maior taxa encontrada entre as diluições (Gráfico 13). Já o MTA Fillapex 24h (1:1 e 1:32) não alterou a produção de CXCL8. A adição do cimento endodôntico MTA Fillapex/24h à cultura de neutrófilos estimulados com LPS não induziu alterações significativas na produção de CXCL8 ao se comparar à produção dos neutrófilos estimulados apenas com meio (128,75 pg/mL) (Gráfico 13). Todas as diluições provocaram um discreto aumento, exceto a 1:1, a qual diminuiu essa produção (75,26 pg/mL).

A adição do MTA Fillapex/48h interferiu na síntese de CXCL8 quando comparado àquela pelos neutrófilos estimulados apenas com meio (Gráfico 14). Todas as diluições induziram um aumento dessa produção, sendo esta estatisticamente significativa nas diluições de 1:4 e 1:8 (46,21 pg/mL e 52,37 pg/mL, respectivamente), exceto para 1:32 que diminuiu a produção, mas não significativamente (112,71 pg/mL). A adição do MTA Fillapex/48h à cultura de neutrófilos estimulados com LPS não induziu alterações na produção de CXCL8 em todas as diluições, apenas a diluição 1:32 induziu um maior aumento dessa produção (151,50 pg/mL) ao se comparar as demais e aos neutrófilos estimulados apenas com LPS (128,75 pg/mL) (Gráfico 14).

Gráfico 13. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 14. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 48 h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.2.4 Sealepox 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com Sealepox/24h na diluição de 1:4 diminuiu a produção de CXCL8 (14,38pg/mL) em relação àquela produzida pelos neutrófilos cultivados apenas com meio (20,46 pg/mL) (Gráfico 15). A concentração de 1:16 não foi capaz de estimular a produção dessa quimiocina. As diluições de 1:8, 1:32 não alteraram a síntese de CXCL8, sendo que a de 1:1 aumentou essa síntese (32,86pg/mL) (Gráfico 15). A adição do cimento endodôntico Sealepox/24h (1:1) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu uma diminuição da produção de CXCL8 (95,15 pg/mL), mas não foi significativa (Gráfico 15). As demais diluições mantiveram o padrão da produção, no entanto, a concentração de 1:32 (138,80 pg/mL) induziu um discreto aumento da síntese de CXCL8.

A adição do cimento Sealepox/48h (1:32 e 1:8) diminuiu a produção de CXCL8 (12,44pg/mL e 7,41pg/mL, respectivamente) em relação àquela produzida pelos neutrófilos cultivados apenas com meio, sendo a da 1:8 a menor produção e estatisticamente significativa (Gráfico 16). A diluição 1:1 induziu a maior produção dessa quimiocina (35,13 pg/mL), tanto entre todas as diluições, como entre os neutrófilos cultivados apenas com meio, mas não de modo significativo. A diluição de 1:16 não estimulou a produção dessa quimiocina. A adição do Sealepox/48h às células cultivadas com LPS não interferiu na produção dessa quimiocina, mantendo os níveis de produção dos neutrófilos estimulados com LPS (Gráfico 16). A diluição de 1:32 induziu um discreto aumento na produção de CXCL8 (143,90pg/mL), o qual foi o maior entre todas as diluições e a dos neutrófilos estimulados apenas com meio.

Gráfico 15. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 16. Produção de CXCL8 pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.3 Cimentos endodônticos interferem com a produção de NO por neutrófilos humanos.

Neutrófilos cultivados apenas com meio produziram altos níveis de óxido nítrico ($65,30\mu\text{M}$) (Gráfico 17). Entretanto, os neutrófilos humanos estimulados com LPS secretaram níveis mais baixos de NO ($55,56\mu\text{M}$), mas não de modo significativo (Gráfico 17).

5.3.1 AH Plus 24 e 48 horas

A estimulação de neutrófilos com o cimento AH Plus/24h nas diluições de 1:4 e 1:16 reduziu a produção de NO ($56,44\mu\text{M}$ e $49,30\mu\text{M}$, respectivamente), quando comparado com aos neutrófilos cultivados apenas com meio (Gráfico 17). As diluições 1:1, 1:8 e 1:32 induziram um aumento na produção deste mediador microbicida ($74,1\mu\text{M}$, $75,70\mu\text{M}$ e $85\mu\text{M}$, respectivamente), mas não foi estatisticamente significativa. A adição do cimento endodôntico AH Plus/24h (1:8) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu a maior produção de NO ($70,65\mu\text{M}$), enquanto que a diluição de 1:16 induziu a menor secreção pelos neutrófilos ($43,86\mu\text{M}$) (Gráfico 17). No entanto, as diluições de 1:1, 1:4 e 1:32 não alteraram a produção de NO ($58,07\mu\text{M}$, $58,20\mu\text{M}$ e $65,77\mu\text{M}$, respectivamente).

A estimulação de neutrófilos por 48 horas com AH Plus alterou a produção de NO (Gráfico 18). A diluição 1:4 induziu a maior produção de NO ($58,76\mu\text{M}$) entre todas as diluições, e a de 1:16 a menor ($27,84\mu\text{M}$), a qual foi estatisticamente significativa quando comparada a dos neutrófilos cultivados apenas com meio. As diluições de 1:1, 1:8 e 1:32 induziram níveis semelhantes de NO entre si e níveis inferiores em relação aos neutrófilos cultivados com meio (Gráfico 18). A adição do AH Plus/48h (1:1 e 1:32) à cultura de neutrófilos estimulados com LPS induziu um aumento na produção de NO ($65,19\mu\text{M}$ e $105,46\mu\text{M}$, respectivamente), sendo este estatisticamente significativo ao se comparar a dos neutrófilos cultivados apenas com LPS (Gráfico 18). A diluição 1:16 induziu a menor síntese de NO ($40,1\mu\text{M}$). As diluições 1:4 ($54,35\mu\text{M}$) e 1:8 ($53,48\mu\text{M}$) não alteraram a produção de NO.

Gráfico 17. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 18. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos AH Plus 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.3.2 Sealapex 24 e 48 horas

A estimulação de neutrófilos com o cimento Sealapex/24h nas diluições de 1:4 e 1:8 manteve os níveis de produção de NO (68,80 μ M e 72,21 μ M, respectivamente) semelhante à dos neutrófilos cultivados apenas com meio. (65,30 μ M) (Gráfico 19). No entanto, as diluições 1:1, 1:16 e 1:32 induziram uma diminuição nos níveis de NO (31 μ M, 43,86 μ M e 55,06 μ M, respectivamente), sendo estatisticamente significativa para 1:1. A adição do Sealapex/24h (1:4, 1:8 e 1:32) às culturas de neutrófilos estimuladas com LPS aumentou a produção do NO (69,07 μ M, 61 μ M, 86,94 μ M respectivamente), sendo esta a maior entre todas as diluições (Gráfico 19). As diluições 1:1 e 1:16 induziram uma diminuição dos níveis de NO ao se comparar aos neutrófilos cultivados com LPS, sendo esta a menor produção (41,35 μ M).

A estimulação de neutrófilos com o cimento Sealapex/48h nas diluições 1:1, 1:8 e 1:16 induziram uma diminuição nos níveis de NO (47,52 μ M, 33,82 μ M e 21,03 μ M, respectivamente), sendo esta a menor entre todas as diluições e estatisticamente significativa em relação aos neutrófilos estimulados apenas com meio (Gráfico 20). As diluições de 1:4 (67 μ M) e 1:32 (63,2 μ M) não alteraram a produção de NO. A adição de Sealapex/48h às culturas estimuladas com LPS não alterou a produção de NO ao se comparar a dos neutrófilos estimulados apenas com LPS, no entanto, a concentração de 1:32 aumentou de modo significativo essa síntese (66,56 μ M) (Gráfico 20). As demais diluições, 1:1 (49,41 μ M), 1:4 (50,19 μ M), 1:8 (45,43 μ M) e 1:32 (48,15 μ M) induziram uma produção semelhante entre elas e entre aos neutrófilos estimulados com LPS.

Gráfico 19. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 20. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealapex 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

5.3.3 MTA Fillapex 24 e 48 horas

Ao estimular os neutrófilos com o cimento MTA Fillapex/24h houve uma discreta alteração dos níveis de NO quando comparados ao dos neutrófilos cultivados apenas com meio (65,30 μ M), exceto para a diluição de 1:32 que induziu um aumento da mesma (101,36 μ M) (Gráfico 21). Entre todas as diluições, a de 1:8 induziu a menor síntese de NO (50,95 μ M). A adição de MTA Fillapex/24h (1:16 e 1:32) às culturas de neutrófilos estimuladas com LPS aumentou a produção de NO (68,53 μ M e 67,85 μ M, respectivamente) (Gráfico 21). A menor taxa foi observada na diluição de 1:4 (49,40 μ M). As concentrações 1:1 e 1:8 não induziram alterações na produção de NO.

A adição do cimento MTA Fillapex/48h não alterou os níveis de NO quando comparado ao dos neutrófilos cultivados com meio (65,30 μ M), exceto na diluição de 1:16 que induziu uma diminuição da mesma (32,58 μ M), sendo estatisticamente significativa (Gráfico 22). Nenhuma das diluições induziu maior produção de NO que os neutrófilos estimulados com meio. A adição de MTA Fillapex/48h às culturas de neutrófilos estimuladas com LPS não induziu alterações nos níveis de produção de NO, exceto a diluição 1:32, que diminuiu a produção de NO (24,47 μ M) de modo estatisticamente significativo (Gráfico 22).

Gráfico 21. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significante quando comparado com controle.

Gráfico 22. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos MTA Fillapex 48h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante quando comparado com controle.

5.3.4 Sealepox 24 e 48 horas

A estimulação dos neutrófilos com o cimento Sealepox/24h nas diluições de 1:4 e 1:32 induziu os maiores níveis de NO (83,86 μ M e 104,67 μ M, respectivamente) quando comparado aos neutrófilos estimulados com meio (65,30 μ M) (Gráfico 23). Já as diluições de 1:1 (58,51 μ M), 1:8 (54,84 μ M) não interferiram na produção de NO, e a de 1:16 interferiu discretamente, aumentando-a (74,67 μ M). A adição de Sealepox/24h às células estimuladas com LPS não interferiu na síntese do NO, apresentando uma taxa de produção semelhante à dos neutrófilos estimulados com LPS, exceto para a diluição 1:1, que induziu um aumento na produção da mesma (82,88 μ M), mas não de modo significativo (Gráfico 23).

Os neutrófilos estimulados com o cimento Sealepox/48h nas diluições de 1:1, 1:8 e 1:32 produziram maiores taxas de NO (77,02 μ M, 104,92 μ M e 95,91 μ M, respectivamente) quando comparados aos neutrófilos estimulados apenas com meio (Gráfico 24). As diluições 1:4 e 1:16 não interferiram na síntese de NO. A adição de Sealepox/48h (1:1, 1:16 e 1:32) às culturas estimuladas com LPS induziram um aumento na produção de NO (98,88 μ M, 83,98 μ M e 76,01 μ M, respectivamente (Gráfico 24). As diluições 1:4 e 1:8 não interferiram nessa síntese (60,20 μ M e 55,32 μ M), produzindo níveis semelhantes aos dos neutrófilos estimulados com LPS.

Gráfico 23. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

Gráfico 24. Produção de Óxido Nítrico pelos neutrófilos humanos expostos aos Sealepox 24h na presença ou ausência de LPS. Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos sadios ($n = 14$) e utilizadas para a separação de neutrófilos. As barras representam a média $\pm$ SEM dos valores de obtidos para cada voluntário testado individualmente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com controle.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O tratamento endodôntico consiste no preparo biomecânico dos canais radiculares e, posteriormente, a obturação dos mesmos com cimentos endodônticos.

Uma vez que o material obturador ficará em íntimo contato com os tecidos periapicais, o mesmo deve apresentar boas propriedades biológicas e físico-químicas a fim de não irritar os tecidos adjacentes, possibilitando, ou mesmo favorecendo, o reparo da região periapical. Dentre as propriedades biológicas destaca-se a biocompatibilidade, a não agressão aos tecidos apicais e periapicais. Muitos parâmetros caracterizam a biocompatibilidade de um material endodôntico, como a genotoxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade ou efeito microbiano (AL-HIYASAT; TAYYAR; DARMANI, 2010).

Sabe-se que a maioria dos produtos exerce algum efeito tóxico quando são frescos, sendo esse efeito reduzido com o passar do tempo, pela diminuição da concentração dos seus componentes (ARAKI; SUDA; SPANGBERG, 1994; THOM et al., 2003). Por conta disso, novos materiais obturadores têm sido formulados na tentativa de obter melhores propriedades físicas e biológicas (BARBOSA; ARAKI; SPANGBERG, 1993).

Diante disso, este estudo foi realizado com o intuito de analisar os efeitos dos cimentos endodônticos AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e Sealepox em diferentes diluições (1:1, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) e tempos de presa (24 e 48 horas) sobre a viabilidade dos neutrófilos humanos por meio do ensaio de apoptose celular, produção de óxido nítrico e da quimiocina CXCL8, uma vez que no tratamento endodôntico cimentos obturadores entram em contato com os tecidos do periápice, condição propícia ao manter a inflamação sob forma crônica localizada (NASSRI; LIA; BOMBANA, 2003)

Dessa forma, visando a biocompatibilidade e não agregação tecidual para o processo de reparo, espera-se dos cimentos endodônticos que os mesmos não interfiram negativamente na apoptose, estimulando-a, na produção de CXCL8, inibindo-a, assim como na síntese de NO, pois CXCL8 é um mediador pró-inflamatório e uma das moléculas quimioatraentes mais potentes, sendo responsável

pela quimiotaxia dos neutrófilos e também de outros granulócitos no local da lesão, e indutor da fagocitose depois da chegada das células, além de ser um potente promotor de angiogênese. O óxido nítrico, mesmo não sendo um oxidante forte, afeta praticamente todas as etapas do processo inflamatório. Grandes quantidades podem ser tóxicas e pró-inflamatórias, pois reagem a uma taxa limitada de difusão com o superóxido para formar peroxinitrito, um forte oxidante, que é sintetizado por células inflamatórias ativadas e células endoteliais estimuladas por agonista, e é responsável pela oxidação de várias moléculas biológicas e ao nitrato de resíduos de tirosina ou da proteínas livres e outros compostos fenólicos (ISCHIROPOULOS et al., 1996; LINARES et al., 2001). Dessa maneira, o óxido nítrico pode ser citotóxico ou citostático.

A utilização de animais para ensaios de biocompatibilidade e citotoxicidade tem sido cada vez mais questionada por razões éticas e econômicas, e especialmente quanto a utilidade dos resultados obtidos. Dessa forma, ensaios de cultura de células para testes de materiais têm sido desenvolvidos de forma a complementar os procedimentos *in vivo* (POLYZOIS, 1994).

Estudos experimentais em animais que examinaram o efeito da exposição do tecido vital relataram mais limitada destruição celular, seguida pela atividade de reparo tecidual (WATTS; PATERSON, 1981). Nos ensaios de cultura celular são difíceis de replicar a obturação do canal radicular e, provavelmente, essa é a principal razão pela qual nas avaliações de biocompatibilidade *in vitro* de tecidos orais não estarem de acordo com os testes em animais *in vivo* (HANKS; WATAHA; SUN, 1996).

As células mais utilizadas para analisar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos são os fibroblastos e macrófagos. Na literatura pouco se encontra de estudos *in vitro* com cultura celular de neutrófilos. Em 2008, Costa et al., demonstraram imigração específica para neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para a cavidade da bolsa de ar em camundongos, sendo esta dependente da dose e do tempo (com um pico em 96 horas após o estímulo) e mediada por leucotrieno -B₄ (LTB₄), interleucina-1, Factor de necrose tumoral α (TNF- α), induzida por citocina quimioatrativa de neutrófilos (KC) e proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP -2) e não depende de macrófagos ou mastócitos (COSTA; DE OLIVEIRA; GOMES-

FILHO, 2008). Em nosso estudo, os mediadores quimiotáticos foram quantificados por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Dessa forma, percebe-se a importância dos neutrófilos no processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio e por outros cimentos endodônticos, e consequente processo de reparo, o objeto do tratamento endodôntico.

Em nosso estudo, o AH Plus demonstrou ser o menos citotóxico dentre os cimentos testados. Diante dos resultados observamos que o mesmo não induziu a apoptose. A diluição 1:4 foi a que menos provocou apoptose dos neutrófilos no período de 24 horas. Já em 48 horas, o melhor comportamento biológico foi percebido na diluição de 1:32.

Em relação à produção de CXCL8, o AH Plus não alterou a sua produção, além disso, não houve diferenças quanto aos períodos experimentais. A diluição 1:32 foi a que menos induziu a sua síntese, já a 1:16 apresentou um pior comportamento biológico, induzindo uma maior produção. Todos os resultados foram semelhantes àquele encontrado nos neutrófilos cultivados apenas com meio.

A produção de Óxido Nítrico foi induzida quando adicionou-se AH Plus aos neutrófilos cultivados com LPS no período de 48 horas. Em contrapartida, nas culturas apenas com meio, não houve essa indução, sendo que tanto em 24 horas, como em 48 horas, a diluição 1:16 apresentou melhor comportamento biológico. Dessa maneira, diante de um ambiente contendo um agente agressor, estimula a produção desse composto importante no desenvolver da resposta inflamatória e resposta imune.

Ao analisar todos os parâmetros em conjunto, percebemos que não houve diferenças significativas entre os períodos experimentais, no entanto, o período de 24 mostrou os melhores resultados para apoptose e 48 horas para síntese de NO. Dessa maneira, podemos estabelecer que o AH Plus confere um melhor comportamento biológico no período de 24 horas.

Estudos têm demonstrado que o AH Plus, um cimento resinoso, libera formaldeído durante sua presa devido a reação entre resina epóxica com a amina. A citotoxicidade desse cimento refere-se à presença do formaldeído, o qual atribuíram à ação mutagênica (GEROSA et al., 1995; SCHWEIKL et al., 1995), além disso,

devido a presença de amina, que acelera a reação de polimerização, pode ser responsável pela toxicidade inicial elevada (ZMENER et al., 1997b). Diferentemente do que foi observado em nosso estudo, Bouillaguet 2006 relatou que a citotoxicidade do AH Plus aumenta com o tempo, assim como relatos anteriores (BOUILLAGUET et al., 2004; HUANG, T.H. et al., 2002). Em contrapartida, alguns autores afirmam que a atividade inflamatória, juntamente com o fornecimento de sangue intacto no processo de reparação tecidual pode eliminar a toxicidade inicial do material (MILETIC et al., 2005).

Oztan et al. (2003) também detectaram bom comportamento biológico do AH Plus sobre fibroblastos de ratos, apresentando uma baixa influência tóxica sobre as células durante o período experimental.

Silva et al. (2013) avaliaram as propriedades físico-químicas e biológicas, como radiopacidade, escoamento e citotoxicidade dos cimentos AH Plus e MTA Fillapex, e da mesma forma, o AH Plus mostrou ser menos citotóxico.

Em nosso estudo, o cimento Sealapex demonstrou ser o segundo cimento menos citotóxico, o qual não provoca alteração na taxa de apoptose dos neutrófilos humanos, nem interfere na síntese de CXCL8, no entanto, diminuiu a produção de Óxido Nítrico.

As menores taxas de apoptose ocorreram nas maiores diluições (1:16 e 1:32), sendo que a 1:32 apresentou o melhor comportamento biológico, em ambos os períodos experimentais, no entanto, em 48 horas foi estatisticamente significativa.

Para CXCL8, a diluição 1:32 diminuiu a sua síntese em ambos os períodos experimentais, entretanto, as demais diluições analisadas em conjunto não induziram alteração alguma. Os melhores resultados foram observados no tempo de 48 horas, onde as diluições induziram uma produção bem semelhante ao grupo controle.

A produção de Óxido Nítrico foi inibida em ambos os períodos experimentais, e observamos uma menor síntese em 48 horas, onde a diluição 1:32 apresentou o pior comportamento biológico, diminuindo estatisticamente essa produção. A diluição 1:4 foi a que mais apresentou excelente comportamento biológico em ambos os períodos.

Os nossos achados condizem com a literatura, a qual mostra que o mesmo tem apresentado, em outros estudos, excelentes propriedades biológicas (HOLLAND; DE SOUZA, 1985; LEONARDO et al., 1995).

Essa característica se deve ao fato desse cimento ser à base de hidróxido de cálcio, um composto biocompatível, que promove formação óssea auxiliando no reparo da região apical e periapical.

Diversos estudos com cimentos contendo hidróxido de cálcio têm mostrado sua menor agressividade celular em comparação com aqueles que contêm óxido de zinco e eugenol ou resinosos (BRISENO; WILLERSHAUSEN, 1992; CATANZARO GUIMARAES; PERCINOTO, 1984; GEROSA et al., 1995; HUANG, F.M. et al., 2002; MATSUMOTO, K.; INOUE; MATSUMOTO, 1989; NAKAMURA et al., 1986; PERASSI et al., 2004).

No entanto, Chang et al observaram uma moderada citotoxicidade para fibroblastos do ligamento periodontal no período de 3 e 18 horas (CHANG et al., 2010). Essa toxicidade possivelmente é resultante dos componentes adicionados na sua composição, como a resina polimetileno metil salicilato e isobutil salicilato (LAPCZYNSKI et al., 2007).

Visando o reparo tecidual da região apical e periapical, o MTA (Agregado de Trióxido Mineral) foi introduzido na prática endodôntica mediante suas propriedades biológicas satisfatórias. Tem como principal componente o óxido de cálcio, que na presença da umidade forma hidróxido de cálcio, um excelente indutor da mineralização, além do poder antimicrobiano devido ao seu elevado pH (BIN et al., 2012; HAUMAN; LOVE, 2003; HOLLAND et al., 1999; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010b; ROBERTS et al., 2008b). Primeiramente foi introduzido na prática endodôntica como material usado em casos de perfurações radiculares, rizogênese incompleta, na obturação retrógrada, entre outras (BIN et al., 2012; HOLLAND et al., 1999; ROBERTS et al., 2008b).

No entanto, apesar dessas propriedades favoráveis, a biocompatibilidade e a indução de formação de tecido mineralizado não estão completamente entendidas e são provavelmente multifatorial (DANESH et al., 2010). Para Hakki et

al. (2009), a bioatividade pode estar por trás da biocompatibilidade e da capacidade de indução da mineralização do MTA .

Recentemente foi lançado no mercado o MTA Fillapex, um cimento para ser usado como material obturador, que apresenta em sua composição além do MTA, o óxido de bismuto e compostos resinosos. Por ser um material recente, é de suma importância avaliar o seu potencial citotóxico.

Nesse estudo, o MTA Fillapex foi o terceiro cimento menos citotóxico, induzindo a apoptose, a produção de CXCL8 e diminuiu a síntese de Óxido Nítrico

A diluição de 1:1 apresentou o melhor comportamento biológico, acarretando na menor taxa de apoptose em ambos os períodos experimentais, exceto para 48 horas sem o LPS. Em contrapartida, a diluição 1:16 foi a mais citotóxica, induzindo significativamente a apoptose quando adicionada ao LPS em 48 horas.

Para CXCL8, a diluição que menos interferiu nessa produção foi a de 1:32, em ambos os períodos, e a diluição de 1:1 em 24 horas. Observamos elevada síntese de CXCL8 nos dois períodos, sendo as maiores taxas em 48 horas, e estatisticamente significativas nas diluições de 1:4 e 1:8. A diluição 1:8 foi a que apresentou o pior comportamento biológico.

Os resultados mostraram que a maior síntese de Óxido Nítrico se deu no período de 24 horas, e entre todas as diluições a de 1:32 induziu a maior produção. Em 48 horas, a diluição 1:32 apresentou o pior comportamento biológico, uma vez que diminuiu, de modo significativamente, a síntese de NO nos neutrófilos cultivados com LPS, uma endotoxina utilizada para simular um ambiente agredido.

O comportamento citotóxico apresentado pela MTA Fillapex pode ser uma consequência dos componentes resinosos, como salicilato presente na sua composição (BIN et al., 2012).

Reforçando essa hipótese, estudos demonstraram 25% de apoptose celular após 24 h de exposição à resina salicilato, em linhagem celular de fibrossarcoma humano (MAHDI et al., 2006). Assim como em nosso estudo, obtiveram que os cimentos iRoot SP, DiaRoot BioAggregate e MTA BRANCO apresentaram-se biocompatíveis, exceto o MTA FILLAPEX que, no período de 90

dias, ainda estimulou uma reação inflamatória moderada, presença de necrose tecidual, CGMNs e macrófagos fagocitando partículas do cimento.

Outro estudo investigou os efeitos do Endo-CPM-Sealer, Sealapex e MTA Angelus sobre a viabilidade celular e produção de IL-1 β e IL-6 por fibroblastos de rato. Concluíram que nenhum dos materiais foram citotóxicos sobre os fibroblastos, uma vez que não inibiram a viabilidade celular, no entanto, o MTA Angelus induziu a produção de IL-1 β significativamente mais do que o grupo controle (GOMES-FILHO et al., 2009b).

Em um estudo desenvolvido por Bin et al. (2012) utilizando o AH Plus, MTA Branco e MTA Fillapex, seus resultados foram bem semelhantes ao nosso. Demonstraram que o MTA Fillapex foi o cimento mais citotóxico, reduzindo drasticamente as taxas de sobrevivência dos fibroblastos de rato, mesmo ao serem expostos a uma diluição intermediária (1:4). Entretanto, observaram que este cimento desenvolveu o melhor comportamento depois de 48 horas, onde houve um aumento da viabilidade celular. Assim como em nosso estudo, AH Plus induziu menor citotoxicidade do que o MTA Fillapex, de uma maneira dependente da diluição.

Como pudemos observar em nosso estudo e nos demais existentes na literatura, o MTA Fillapex altera a viabilidade celular, e sabendo da importância do comportamento biológico dos cimentos endodônticos, os quais devem manter a homeostasia local pra não interferir nos processos de reparo e inflamatório, é fundamental que os cimentos endodônticos não promovam morte celular, mantendo viáveis as células da resposta imune e inflamatória, como os neutrófilos.

O cimento de Sealepox desenvolvido na disciplina de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, apresentou o pior comportamento biológico, uma vez que interferiu na produção de CXCL8, mesmo não alterando a síntese de Óxido Nítrico e diminuindo a apoptose.

Observamos que as maiores diluições (1:16 e 1:32) induziram as menores taxas de apoptose. O cimento no período de 24 horas apresentou melhor comportamento biológico, sendo que quando adicionados aos neutrófilos cultivados

com LPS no período de 48 horas, induziu um aumento da taxa de apoptose, dessa forma, os melhores resultados ocorreram em 24 horas.

A produção de CXCL8 foi prejudicada com a adição do Sealapex, sendo que a diluição 1:16 apresentou o pior comportamento biológico, uma vez que inibiu a sua síntese em ambos os períodos experimentais, sendo que em 48 horas, a diluição 1:8 também interferiu, diminuindo essa síntese de modo significativo. As menores taxas foram observadas em 48 horas.

Para a síntese de Óxido Nítrico, apenas a diluição 1:32 apresentou um comportamento semelhante em ambos os períodos experimentais, aumentando a sua produção. Por outro lado, as menores produções foram induzidas por 1:8, exceto em 48 horas nas culturas cultivados sem o LPS. A adição ao LPS no período de 24 horas não induziu alteração da mesma. As maiores taxas foram induzidas no período de 48 horas.

Por conta do cimento Sealepox ser um cimento experimental, com poucas pesquisas e estas de caráter físico-químicas, tem sido difícil discutir os nossos resultados, devido à falta de estudos anteriores.

O fato do MTA Fillapex e do Sealepox induzirem uma diminuição da produção de CXCL8 fez com que esses cimentos se comportassem negativamente, uma vez que as citocinas representam uma classe de mediadores de extrema importância para o processo inflamatório, pois formam um grupo de substâncias multifuncionais envolvidas em diversas etapas da inflamação, podendo influenciar a resposta inflamatória de forma a favorecer ou inibir o processo. Geralmente as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e IL-12) estão envolvidas no início e amplificação da resposta, enquanto que as antiinflamatórias, como IL-10, modulam os eventos tardios, no intuito de controlar a resposta imune. Dessa forma, a diminuição local dessa quimiocina prejudica o processo inflamatório, o que não é esperado, pois além disso, para ocorrer o processo de reparo, é imprescindível a inflamação (CALIXTO et al., 2004; LAWRENCE; GILROY, 2007)

6 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos por esta metodologia em relação à citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus, Sealapex, MTA Fillapex e Sealepox demonstram que:

Os cimentos AH Plus e Sealapex foram os menos citotóxicos, isto é, que menos interferiram na viabilidade celular e na sua função (não indução de CXCL8 e na produção de NO), tanto em 24 horas como em 48 horas.

MTA Fillapex e o Sealepox apesar de causarem mais morte celular e interferirem na produção de NO e CXCL8, seus efeitos podem ser aceitáveis, uma vez que os níveis dessas alterações são, de tal maneira discretos, não agressivos.

Devido a poucas pesquisas nesse âmbito, tanto com os neutrófilos, assim como os cimentos MTA Fillapex e Sealepox, mais análises devem ser realizadas para comprovar definitivamente a citotoxicidade desses cimentos.

Referências

REFERÊNCIAS

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993;54:1-78.

Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International Endodontic Journal.* 2010;43(2):148-53.

Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science; 2002.

Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.

Antignani A, Youle RJ. The cytokine, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), can deliver Bcl-XL as an extracellular fusion protein to protect cells from apoptosis and retain differentiation induction. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(15):11246-54.

Araki K, Suda H, Spangberg LS. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 1994;20(2):67-70.

Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000;26(8):462-5.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1045-9.

Barbosa SV, Araki K, Spangberg LSW. Cytotoxicity of Some Modified Root-Canal Sealers and Their Leachable Components. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics.* 1993;75(3):357-61.

Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. *Technical Aspects: Clinical Flow Cytometry Principles and Application.* Library of Congress. 1993.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994;15(2):74-80.

Bilate AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clínica*. 2007;8(2):47-51.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012;38(4):495-500.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.

Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(2):182-7.

Briseno BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity with human gingival Fibroblasts. III. Calcium hydroxide-based sealers. *J Endod*. 1992;18(3):110-3.

Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*. 2004;70(2):93-103.

Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2008;41(5):408-17.

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

Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, et al. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood*. 1999;94(8):2880-9.

Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, McDonald PP, Trinchieri G. Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem J*. 1995;310 (Pt 3):751-5.

Catanzaro Guimaraes SA, Percinoto C. Effect of some endodontic materials on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. *J Endod*. 1984;10(3):101-4.

Chang MC, Lin LD, Chen YJ, Tsai YL, Cheng YA, Kuo CS, et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal*. 2010;43(3):251-7.

Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health*. 1998;88(12):37-9.

Consolaro A. *Inflamação e Reparo*. Maringá: Dental Press; 2009.

Costa MM, de Oliveira SH, Gomes-Filho JE. Mechanism of calcium hydroxide-induced neutrophil migration into air-pouch cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(6):814-21.

Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(2):232-7.

Crippen TL, Klasing KC, Hyde DM. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant production by primary rat alveolar type II cells. *Inflammation*. 1995;19(5):575-86.

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *Journal of Immunology*. 1999;162(4):2341-6.

Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med*. 1989;170(5):1787-92.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-45.

Danesh F, Tootian Z, Jahanbani J, Rabiee M, Fazelpour S, Taghva O, et al. Biocompatibility and mineralization activity of fresh or set white mineral trioxide aggregate, biomimetic carbonated apatite, and synthetic hydroxyapatite. *J Endod*. 2010;36(6):1036-41.

De Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru M, Silva LAB. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *International Endodontic Journal*. 2000;33(1):25-7.

de Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, de Souza Cortes MI, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod*. 2003;29(2):95-9.

DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest*. 1992;90(5):2123-9.

Di Felice R, Lombardi T. Gingival and mandibular bone necrosis caused by a paraformaldehyde-containing paste. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14(4):196-8.

Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International Endodontic Journal*. 2007;40(5):329-37.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.

Euler GJ, Miller GA, Hutter JW, D'Alesandro MM. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. *J Endod*. 1998;24(7):480-4.

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

Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest*. 1995;96(1):107-16.

Furie MB, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*. 1995;146(6):1287-301.

Gerosa R, Menegazzi G, Borin M, Cavalleri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J Endod*. 1995;21(9):446-8.

Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):333-55.

Geurtsen W, Leinenbach F, Krage T, Leyhausen G. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(5):592-7.

Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials--histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig*. 1997;1(1):5-11.

Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pagavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. *Dent Traumatol*. 2002;18(4):217-21.

Godaly G, Hang L, Frendeus B, Svanborg C. Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *Journal of Immunology*. 2000;165(9):5287-94.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabe PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod*. 2009a;35(2):256-60.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod*. 2009b;35(11):1577-9.

Grossman LI. *Endodontics Practice*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1978.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.

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

Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal*. 2003;36(2):75-85.

Hayashi M, Shimizu A, Ebisu S. MTA for obturation of mandibular central incisors with open apices: case report. *J Endod*. 2004;30(2):120-2.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.

Holland R, de Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod*. 1985;11(12):535-43.

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

Honma M, Hayakawa Y, Kosugi H, Koizumi F. Localization of mRNA for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by in situ hybridization, and induction of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to radicular cyst contents. *J Oral Pathol Med*. 1998;27(8):399-404.

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. *International Endodontic Journal*. 2002;35(2):153-8.

Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod*. 2005;31(9):679-83.

Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L. Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol*. 1992;141(4):981-8.

Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(1):77-83.

Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, et al. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol*. 2003;74(5):942-51.

Ischiropoulos H, Nelson J, Duran D, Al-Mehdi A. Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):373-81.

Janeway Jr CA, Traves P. Imunidade mediada por células T. In: Janeway Jr C, Traves P. *Imunologia: sistema imunológico na saúde e na doença*, editor. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p. 132-56.

Johann AM, Barra V, Kuhn AM, Weigert A, von Knethen A, Brune B. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. *Faseb Journal*. 2007;21(11):2704-12.

Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(6):625-36.

Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal*. 2003;36(8):527-32.

Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Orstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2005;38(7):483-8.

Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol 2000*. 2007;45:14-34.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran *Patologia: bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Laguri C, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr Res*. 2008;343(12):2018-23.

Lapczynski A, Jones L, McGinty D, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on methyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45:S428-S52.

Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*. 1989;243(4897):1464-6.

Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Role of inflammatory cytokines and nitric oxide in hepatic and pulmonary toxicity. *Toxicology Letters*. 1998;103:289-93.

Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol*. 2007;88(2):85-94.

Lee DH, Kim NR, Lim BS, Lee YK, Hwang KK, Yang HC. Effects of root canal sealers on lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 mRNA in murine macrophage cells. *J Endod*. 2007;33(11):1329-33.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate for Repair of Lateral Root Perforations. *J Endod*. 1993;19(11):541-4.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1999;276(6):H1943-H50.

Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med*. 1988;109(2):127-42.

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

Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. *J Endod*. 1995;21(3):137-41.

Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999a;88(2):221-5.

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

Leonardo MR, Leal JM. Fases do tratamento do sistema de canais radiculares. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. São Paulo; 1998.

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

Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod*. 1999;25(2):109-13.

Limkangwalmongkol S, Burtscher P, Abbott PV, Sandler AB, Bishop BM. A comparative study of the apical leakage of four root canal sealers and laterally condensed gutta-percha. *J Endod*. 1991;17(10):495-9.

Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1234-42.

Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clinical and Experimental Immunology*. 1985;62(3):738-45.

Lokuta MA, Huttenlocher A. TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):210-9.

Lopes HP, Siqueira JR JF. *Endodontia: biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2010.

Lopez-Farre A, Rodriguez-Feo JA, Sanchez de Miguel L, Rico L, Casado S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30(10):1095-106.

Lyons MJ, Yoshimura T, McMurray DN. Interleukin (IL)-8 (CXCL8) induces cytokine expression and superoxide formation by guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2004;84(5):283-92.

Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(8):1041-50.

Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001;2(2):95-101.

Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods.* 1990;31(1):43-6.

Mahdi JG, Alkarrawi MA, Mahdi AJ, Bowen ID, Humam D. Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Prolif.* 2006;39(4):249-60.

Manfro RC, Barros EJG, Saitovitch D. Introdução à biologia celular e molecular. In: Barros, EJG, Manfro RC, Tomé FS, Gonçalves LFS e colaboradores *Nefrologia: Rotinas, Diagnóstico e Tratamento* 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 1999.

Maroto M, Barberia E, Planells P, Vera V. Treatment of a non-vital immature incisor with mineral trioxide aggregate (MTA). *Dent Traumatol.* 2003;19(3):165-9.

Martin K, Viera K, Petr C, Marie N, Eva T. Simultaneous analysis of cytokines and co-stimulatory molecules concentrations by ELISA technique and of probabilities of measurable concentrations of interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 occurring in plasma of healthy blood donors. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(5):65237.

Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endod.* 1989;15(2):60-7.

Matsumoto T, Yokoi K, Mukaida N, Harada A, Yamashita J, Watanabe Y, et al. Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J Leukoc Biol.* 1997;62:581-7.

Melani C, Mattia GF, Silvani A, Care A, Rivoltini L, Parmiani G, et al. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood.* 1993;81(10):2744-9.

Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod.* 2005;31(4):307-9.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.

Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal.* 2008;20(3):557-68.

Morgan KT, Gross EA, Patterson DL. Distribution, progression, and recovery of acute formaldehyde-induced inhibition of nasal mucociliary function in F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;86:161-76.

Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PMP. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International Endodontic Journal.* 2011;44(12):1128-33.

Mutal L, Gani O. Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *International Endodontic Journal.* 2005;38(10):690-6.

Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, et al. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod.* 1996;22(1):9-12.

Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto Y, Hirano S, Hayakawa H, Sakai K, et al. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endod.* 1986;12(4):156-60.

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

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology.* 2006;6(3):173-82.

Okuda Y, Sakoda S, Shimaoka M, Yanagihara T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. *Immunol Lett.* 1996;52(2-3):135-8.

Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981;7(8):355-67.

Ørstavik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics*. 2005;12:25–38.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *J Endod*. 2010a;36(3):400-13.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010b;36(1):16-27.

Passaglia LMP, Zaha A. Técnicas do DNA recombinante. In: Zaha, A *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto; 1996.

Pavlakakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney International*. 1996;49:S7-S12.

Perassi FT, Filho IB, Berbert FL, Carlos IZ, de Toledo Leonardo R. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *J Endod*. 2004;30(7):534-7.

Peterson FC, Thorpe JA, Harder AG, Volkman BF, Schwarze SR. Structural determinants involved in the regulation of CXCL14/BRAK expression by the 26 S proteasome. *J Mol Biol*. 2006;363(4):813-22.

Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A Novel Neutrophil-Activating Factor Produced by Human Mononuclear Phagocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;167(5):1547-59.

Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater*. 1994;16(1):21-60.

Queiroz SL, Batista AA. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím Nova*. 1999 São Paulo July/Aug.

Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett*. 2003;85(1):75-80.

Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dental Materials*. 2008a;24(2):149-64.

Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*. 2008b;24(2):149-64.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.

Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;191(2):503-8.

Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 1997;61(4):375-80.

Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000;177:195-203.

Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res*. 2012;26(5):424-30.

Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(4):504-8.

Schweikl H, Schmalz G, Stimmelmayer H, Bey B. Mutagenicity of AH26 in an in vitro mammalian cell mutation assay. *J Endod*. 1995;21(8):407-10.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.

Shabahang S, Torabinejad M. Treatment of teeth with open apices using mineral trioxide aggregate. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 2000;12(3):315-20; quiz 22.

Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod*. 2001;27(12):749-52.

Simersky R, Swaczynova J, Morris DA, Franek M, Strnad M. Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk. *Veterinarni Medicina*. 2007;52(1):19-28.

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

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

Sonat B, Dalat D, Gunhan O. Periapical Tissue Reaction to Root Fillings with Sealapex. *International Endodontic Journal*. 1990;23(1):46-52.

Sosroseno W, Herminajeng E. The role of macrophages in the induction of murine immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol*. 2002;51(7):581-8.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498-521.

Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;18(9):422-6.

Steinig TH, Regan JD, Gutmann JL. The use and predictable placement of Mineral Trioxide Aggregate in one-visit apexification cases. *Aust Endod J*. 2003;29(1):34-42.

Stuart WW, Crowley LV, Turner DW, Pelleu GB, Jr., Osetek EM. Humoral response to endodontic cements. *J Endod*. 1979;5(7):214-7.

Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endod*. 1998;24(3):157-60.

Theilgaard-Monch K, Porse BT, Borregaard N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):54-60.

Thelen M, Peveri P, Kernen P, Vontscharner V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of Neutrophil Activation by Naf, a Novel Monocyte-Derived Peptide Agonist. *Faseb Journal*. 1988;2(11):2702-6.

Thom DC, Davies JE, Santerre JP, Friedman S. The hemolytic and cytotoxic properties of a zeolite-containing root filling material in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(1):101-8.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995;21(7):349-53.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. *J Endod*. 2010;36(2):190-202.

Torabinejad M, Watson TF, Ford TRP. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate When Used as a Root End Filling Material. *J Endod*. 1993;19(12):591-5.

Trifillieff A, Fujitani Y, Mentz F, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *Journal of Immunology*. 2000;165(3):1526-33.

Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *International Endodontic Journal*. 1980;13(3):131-8.

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

Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(6):e35-8.

Vizgirda PJ, Liewehr FR, Patton WR, McPherson JC, Buxton TB. A comparison of laterally condensed gutta-percha, thermoplasticized gutta-percha, and mineral trioxide aggregate as root canal filling materials. *J Endod*. 2004;30(2):103-6.

Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):349-74.

Wallach D, Vignon-Pennamen MD. From acute febrile neutrophilic dermatosis to neutrophilic disease: forty years of clinical research. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(6):1066-71.

Watts A, Paterson RC. Cellular responses in the dental pulp: a review. *International Endodontic Journal*. 1981;14(1):10-9.

White MV, Yoshimura T, Hook W, Kaliner MA, Leonard EJ. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett*. 1989;22(2):151-4.

Witherspoon DE, Ham K. One-visit apexification: technique for inducing root-end barrier formation in apical closures. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001;13(6):455-60; quiz 62.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.

Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ, Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10(2):148-53.

Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *International Endodontic Journal*. 2003;36(11):774-9.

Yared GM, Bou Dagher F. Sealing ability of the vertical condensation with different root canal sealers. *J Endod*. 1996;22(1):6-8.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.

Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. *International Endodontic Journal*. 1997a;30(5):332-4.

Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. *Int Endod J*. 1997b;30(5):332-4.

Anexo

ANEXO I - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 059/2011

Bauru, 5 de setembro de 2011.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Produção de CXCL8 por macrófagos e neutrófilos estimulados com cimentos endodônticos**, a ser desenvolvido pela aluna Milena da Silva, sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos