RAQUEL ASSED BEZERRA DA SILVA

**HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À CLOREXIDINA – ESTUDO EM
CULTURA DE CÉLULAS (RAW 264.7 E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS
DA LINHAGEM OSTEOLÁSTICA) E EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE
CAMUNDONGOS. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor no Programa
de Pós-Graduação em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo

Ribeirão Preto

2007

Silva, Raquel Assed Bezerra

Hidróxido de Cálcio associado à Clorexidina – Estudo em Cultura de Células (RAW 264.7 e Cultura Primária de Células da Linhagem Osteoblástica) e em Tecido Subcutâneo de Camundongos. Avaliação da Atividade Antimicrobiana
Ribeirão Preto, 2007.

92 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa: Odontopediatria

Orientador: Leonardo, Mário Roberto.

1. Hidróxido de cálcio
2. clorexidina
3. cultura de células
4. atividade antimicrobiana
5. biocompatibilidade

RAQUEL ASSED BEZERRA DA SILVA

**HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À CLOREXIDINA – ESTUDO EM
CULTURA DE CÉLULAS (RAW 264.7 E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS
DA LINHAGEM OSTEoblástica) E EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE
CAMUNDONGOS. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor no Programa
de Pós-Graduação em Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

RAQUEL ASSED BEZERRA DA SILVA

Nascimento	11 de janeiro de 1980 – Ribeirão Preto/SP
Filiação	Ernani Bezerra da Silva Léa Assed Bezerra da Silva
1999-2002	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003-2005	Colaboração no Curso de Aperfeiçoamento de Atendimento Odontológico a Pacientes Portadores de Necessidades Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP
2006-2007	Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

"SE VI MAIS LONGE FOI POR TER ME APOIADO EM OMBROS GIGANTES"

ISAAC NEWTON

DEDICO ESSE TRABALHO

A **Deus**, por me mostrar o melhor caminho, me dar forças e olhar por mim, sempre!

À minha mãe, **Léa Assed Bezerra da Silva**, por ser meu maior exemplo de amor, garra e alegria. Uma pessoa singular, diferenciada, única! Obrigada pelo seu amor!

Ao meu pai, **Ernani Bezerra da Silva**, grande homem, símbolo da honestidade e do amor à família. Obrigada pelo seu apoio incondicional!

Ao meu irmão, **Ricardo Assed Bezerra da Silva**, meu ídolo, ser humano incomparável, símbolo de um grande vencedor e de um grande coração. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

Ao meu irmão, **Paulo Nelson Filho**, pela paciência e carinho. Meu grande amigo, sempre ao meu lado. Obrigada por fazer parte da minha família!

À minha segunda mãe, **Sebastiana Maria Vicente**, por todo o seu amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo*, por todos os seus ensinamentos, importantes para o crescimento profissional e para a vida. Um exemplo de mestre, incansável, sempre pronto e disposto a ensinar e ajudar. Fica aqui registrada minha grande admiração!

À minha tia, *Profª. Dra. Sada Assed*, professora do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, grande exemplo de amor à vida e à profissão. Agradeço seu amor, seu carinho e apoio.

À *Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas*, professora do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, grande exemplo de amor ao próximo, dedicação e paciência. Obrigada por acreditar em mim.

Ao *Prof. Dr. Alberto Consolaro*, professor do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, grande mestre, exemplo de amor a profissão e ao ensino. Meus agradecimentos pelo apoio no processamento e análise microscópica em tecido subcutâneo.

À *Profª. Dra. Izabel Yoko Ito*, professora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, grande ícone da Odontologia e exemplo de dedicação.

Ao *Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira*, professor do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, por todos os ensinamentos no estudo em cultura da linhagem osteoblástica, amizade e paciência.

À *Profª. Dra. Lúcia Helena Faccioli*, professora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, pela atenção e disponibilidade do laboratório de Imunologia na pesquisa em cultura de macrófagos. Obrigada pelo carinho a mim dedicado.

À *Profª. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros*, por todo o tempo disponibilizado para a execução desse trabalho. Seus ensinamentos foram preciosos, sempre com muita paciência e tranquilidade para ensinar. Minha admiração!

Ao *Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti*, professor do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, pela amizade sincera e por toda a colaboração, imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Ao *Prof. Dr. Adalberto Luis Rosa*, professor do Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, pela disponibilidade na utilização do Laboratório de Cultura de Células pela transmissão de seus conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, na pessoa da atual Presidente *Profª. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva*, por todo o apoio.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, *Profª. Dra. Sada Assed. Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profª. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profª. Dra. Kranya Victoria D'áz Serrano, Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto e Profª. Alexandra Mussolino de Queiroz*, por toda a atenção e compreensão.

Aos professores da Disciplina de Ortodontia do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, *Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Prof. Dr. Tarcísio Lima Ferreira, Profª. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto e Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní*, pelo apoio e agradável convivência.

À *Profª. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva*, do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, pela imprescindível contribuição na análise estatística dos resultados.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, *Marco Antônio dos Santos, Nilva Aparecida Afonso Ruggiero, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Carmo Eurípedes Terra Barretto e Renata Aparecida Fernandes*, pela agradável convivência e colaboração constante.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, *Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto*, pela dedicação e carinho dispensados a todos os alunos de pós-graduação.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, *Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Valéria Pontelli Navarro Tedeschi, Alexandra Mussolino de Queiroz, Marta Estela Saravia, Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, Soraia Monique Fiorati Aguiar e Sara Elisa Medina Mattar*, pela agradável convivência.

Às amigas, *Dra. Gabriela Giro e Dra. Andréia Carlos Katafuti*, exemplos de seres humanos e de profissionais. Obrigada pelo incentivo constante e pela amizade sincera.

Aos amigos, *Roberto Seixas Pontes, Renata Afonso Pontes, Leonardo Felipe Jabour de Sá, Fernanda Carlos Katafuti, Gustavo Morais Martins, Fabiano Kogawa, Adriana de Carvalho Nogueira Bittar, Alessandro Spanó Melo, Tauana Boemer*, pessoas iluminadas que alegam a minha vida. Obrigada pelo carinho constante.

Aos queridos amigos *Marco Fiori Júnior e Vinícius Humberto Nunes*, que sempre vibram e torcem pelo meu sucesso. Vocês são muito especiais para mim. Obrigada pelo carinho.

Aos meus amigos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, *Gisela Coutinho Magnin, Luciano Elias da Cruz Perez, Matheus Guilherme Lucas, Pablo Araújo, Vinícius Scarpa e Silva, Marcel Teraoka, Hermes Pretel, Márcio Henrique Carrera Fernandes, Frank Ikeda e Alisson Veríssimo*, que fizeram parte da minha vida acadêmica e que até hoje estão presentes me incentivando, sempre.

Aos amigos *Roberto de Oliveira Jabur, Carolina Paes Torres Mantovani, Jaciara Miranda Gomes da Silva, Fátima Rizóli, Marta Maria Martins Giamatei Contente e Gisele Faria*, pelo grande apoio e pelos agradáveis momentos que passamos juntos.

Ao meu companheiro e grande amigo, *Edécio Garcia Júnior*, pelo seu carinho e paciência em momentos tão importantes da minha vida. Uma pessoa especial, que torna o meu dia mais feliz quando está por perto. Obrigada, de coração!!

Ao funcionário *Roger Rodrigo Fernandes* e aos alunos de Mestrado *Larissa Moreira Spinola de Castro* e *Lucas Novaes Teixeira*, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, por toda a atenção despendida no estudo em cultura de células, indispensável para a realização desse trabalho.

Às alunas de Mestrado *Adriana Secatto* e *Elyara Maria Soares* do Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, pelo grande apoio na parte experimental do estudo em cultura de células. Obrigada pela atenção!

À funcionária *Fátima Aparecida Silveira* e as estagiárias Thaís Tavares Souza e Leniza Pola Silva, do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, pela valiosa colaboração na confecção das lâminas no estudo em subcutâneo de camundongos.

Ao *Júlio César de Matos* e *Cláudia Regina Corrêa de Matos*, pela diagramação e impressão desse trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização dessa pesquisa.

RESUMO

Silva, RAB. Hidróxido de Cálcio associado à Clorexidina – Estudo em Cultura de Células (RAW 264.7 e Cultura Primária de Células da Linhagem Osteoblástica) e em Tecido Subcutâneo de Camundongos. Avaliação da Atividade Antimicrobiana [tese]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2007.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®), associada ou não ao digluconato de clorexidina a 0,4%, em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7, cultura primária de células da linhagem osteoblástica e em tecido subcutâneo de camundongos. Além disso, foi avaliada a atividade antimicrobiana desses materiais. Em cultura de macrófagos RAW 264.7 foram avaliados os seguintes aspectos: a viabilidade celular (Ensaio de MTT), propriedades imunoestimuladoras (dosagem de óxido nítrico) e propriedades antiinflamatórias (dosagem de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 α). Em cultura primária de células da linhagem osteoblástica foram avaliados viabilidade celular (períodos de 3, 7 e 10 dias), conteúdo de proteína total (Método de Lowry modificado nos períodos de 7 e 10 dias), atividade da fosfatase alcalina (liberação de timoltaleína nos períodos de 7 e 10 dias e *in situ* pelo método do *Fast red*), proteínas da matriz não-colágena (marcação por Imunofluorescência Indireta e Fluorescência Direta por meio da utilização da faloidina e DAPI, nos períodos de 3, 7 e 14 dias) e formações nodulares de matriz mineralizada (marcação pelo vermelho de Alizarina nos períodos de 3, 7 e 14 dias). A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar, sobre 2 microrganismos indicadores (*Enterococcus faecalis* e *Kocuria rhizophila*). A biocompatibilidade após implantação de tubos de polietileno contendo as pastas no tecido subcutâneo de camundongos isogênicos Balb/c. Os dados numéricos foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com nível de significância de 5%. Os resultados referentes à exposição das células da linhagem RAW 264.7 de macrófagos evidenciou baixa atividade imunoestimuladora da pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®), associada ou não ao digluconato de clorexidina 0,4%, nas diferentes concentrações avaliadas. Por outro lado, pôde-se observar atividade antiinflamatória, com inibição na liberação de óxido nítrico e das citocinas (TNF- α e IL1- α), quando da utilização da associação hidróxido de cálcio e clorexidina na concentração de 25 μ g/ml. Resultados semelhantes ao controle foram observados após a avaliação da pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®), associada ou não ao digluconato de clorexidina a 0,4% em cultura primária de células da linhagem osteoblástica uma vez que os dados numéricos do conteúdo de proteína total, da quantidade de fosfatase alcalina e das formações nodulares de matriz mineralizada não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Em relação à caracterização morfológica das culturas primárias os resultados obtidos foram semelhantes quando comparou-se a pasta Calen®, associada ou não à clorexidina a 0,4%. Em relação à atividade antimicrobiana, a associação hidróxido de cálcio e clorexidina promoveu a formação de maiores halos de inibição (em mm), em relação ao *Enterococcus faecalis*, embora sem diferença estatística significativa com os demais grupos avaliados ($p > 0,05$). No tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos, a análise microscópica demonstrou ser esta associação biocompatível, com tecido circunjacente e reacional, apresentando fibrosamento discreto e semelhante ao tecido conjuntivo fibroso normal, aos 63 dias de avaliação, sem diferença estatística com grupo controle ($p > 0,05$). Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos pode-se concluir que a adição da clorexidina não apresentou benefícios adicionais à pasta à base de hidróxido de cálcio.

ABSTRACT

Silva, RAB. Calcium hydroxide associated to chlorhexidine – Study in cell culture (RAW 264.7 and primary cell culture of osteoblastic lineage), and in mice subcutaneous tissue. Evaluation of Antimicrobial Activity [thesis]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2007.

The aim of this study was to evaluate the calcium hydroxide-based paste (Calen®), associated or not to 0.4% chlorhexidine digluconate, in culture of RAW 264.7 macrophages lineage, primary culture of osteoblastic lineage, and mice subcutaneous tissue. Besides we evaluated the antimicrobial activity of those materials. In RAW 264.7 macrophages culture the followed aspects were evaluated: cellular viability (MTT assay), immunestimulatory (nitric oxide detection) and anti-inflammatory (nitric oxide, TNF- α and IL-1 α detection) properties. In primary cell culture of osteoblastic lineage we evaluated the cellular viability for 3, 7 and 10 days, total protein content (Lowry modified method for 7 and 10 days), alkaline phosphatase activity (thymolphthalein liberation for 7 and 10 days, and *in situ* by *Fast red* method), extracellular matrix non-collagen protein (stained by indirect immunofluorescence and direct fluorescence by phalloidin and DAPI for 3, 7 and 14 days), and mineralized matrix nodular formation (stained by Alizarin red for 3, 7 and 14 days). Antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion test with *Enterococcus faecalis* and *Kocuria rhizophila* as indicators, and the biocompatibility after polyethylene tubes with the paste implanted into Balb/c mice subcutaneous tissue. The data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post test, considering a level of significance of 5%. The results of macrophage RAW 264.7 cells lineage exposition showed low stimulatory activity for the different concentrations evaluated of calcium hydroxide-based paste (Calen®), associated or not to 0.4% chlorhexidine digluconate. On the other hand, we could observe anti-inflammatory activity with inhibition of nitric oxide and cytokines quantification (TNF- α e IL-1 α), after the use of 25 μ g/ml calcium hydroxide associated to chlorhexidine (25 μ g/ml). Same results to the control were observed after evaluation of Calen® paste associated or not to 0.4% chlorhexidine digluconate, in culture of RAW 264.7 macrophages lineage, primary culture of osteoblastic lineage because the data of total protein content, alkaline phosphatase, and mineralized matrix nodular formation were not statistically different ($p>0.05$). In relation to the morphological characterization of primary culture, the results obtained were the same after comparison of Calen® paste, associated or not to 0.4% chlorhexidine digluconate. About antimicrobial activity, the association Calcium hydroxide and chlorhexidine promoted formation of largest inhibition halo (in mm) for *Enterococcus faecalis*, but with no statistically significant with others evaluated groups ($p>0.05$). The microscopic analysis in mice conjunctive subcutaneous tissue demonstrated biocompatibility of that association with the around and reactional tissue, showing a discrete fibrosis, as well as the normal conjunctive fibrous tissue after 63 days of evaluation with no statistically difference with the control group ($p>0.05$). Based on the methodology used, and the results obtained in this work, we could conclude that the addition of chlorhexidine showed no additional benefits to the calcium hydroxide-based paste.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
PROPOSIÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODO.....	20
1) Estudo em Cultura de Macrófagos RAW 264.7 - Avaliação da Viabilidade Celular e das Propriedades Imunoestimuladoras e Antiinflamatórias.....	21
2) Estudo em Cultura Primária de Células da Linhagem Osteoblástica - Avaliação da Viabilidade Celular, Conteúdo de Proteína Total, Atividade da Fosfatase Alcalina, Proteínas da Matriz Não-Colágena e Formações Nodulares de Matriz Mineralizada.....	25
3) Atividade Antimicrobiana - Teste de Difusão em Ágar.....	31
4) Estudo em Camundongos Isogênicos - Resposta em Tecido Conjuntivo Subcutâneo.....	33
RESULTADOS.....	37
1) Estudo em Cultura de Macrófagos RAW 264.7 - Avaliação da Viabilidade Celular e das Propriedades Imunoestimuladoras e Antiinflamatórias.....	38
2) Estudo em Cultura Primária de Células da Linhagem Osteoblástica - Avaliação da Viabilidade Celular, Conteúdo de Proteína Total, Atividade da Fosfatase Alcalina, Proteínas da Matriz Não-Colágena e Formações Nodulares de Matriz Mineralizada.....	50
3) Atividade Antimicrobiana - Teste de Difusão em Ágar.....	56
4) Estudo em Camundongos Isogênicos - Resposta em Tecido Conjuntivo Subcutâneo.....	58
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O processo de reparo das lesões periapicais crônicas pós-tratamento endodôntico é demonstrado, histologicamente, pela predominância de certas características estruturais, tais como a gradativa redução do edema, a diminuição ou o desaparecimento do processo inflamatório, a proliferação e maturação das fibras colágenas do tecido conjuntivo periapical, a redução do espessamento do ligamento periodontal, a aposição de osso neoformado na periferia das trabéculas ósseas pré-existentes e a neoformação cementária junto às áreas de reabsorção do cimento e da dentina (Seltzer, 1988; Cohen e Hargreaves, 2007).

Esse processo de reparo, que ocorre após o tratamento endodôntico radical, pode ser influenciado por fatores sistêmicos, tais como nutrição, estresse, estados crônicos debilitantes, alterações hormonais e vitamínicas e a idade. Fatores locais como a presença de corpos estranhos nos tecidos periodontais, interferências no suprimento sanguíneo, compressão dos tecidos periapicais, hemorragia e infecção também podem atuar, impedindo ou retardando a evolução da reparação (Seltzer, 1988).

No processo de reparo de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, casos didaticamente classificados como necropulpectomia II (Leonardo, 2005), atenção primordial deve ser dada às bactérias presentes no canal radicular, por exercerem um papel decisivo no desenvolvimento e manutenção dessas lesões, fazendo com que um dos objetivos do tratamento endodôntico, nesses casos, seja a eliminação das mesmas (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 1981; Haapasalo et al., 2007; Siqueira et al., 2007).

Após o “combate” ao processo infeccioso e sua eliminação, fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos, à semelhança do que ocorre nas biopulpectomias, determinarão a reparação (Leonardo, 2005), cujo tempo varia em função da magnitude da lesão periapical, além dos fatores anteriormente mencionados.

Ainda, atualmente admite-se que, mesmo após o tratamento endodôntico de dentes infectados e com lesão periapical crônica, as bactérias podem persistir nas ramificações do canal, nos túbulos dentinários expostos, nas lacunas do cimento celular e no forame apical, ou seja, fora da luz do canal radicular. Assim, as técnicas rotineiramente usadas durante o tratamento endodôntico possivelmente não as eliminem e, em particular, as bactérias oxigênio-sensíveis podem sobreviver e, conseqüentemente, manter o processo infeccioso nos tecidos periapicais (Tronstad et

al., 1987; Haapasalo et al., 2003; Waltimo et al., 2003). A baixa porcentagem de sucesso, observada nas avaliações de casos de necropulpectomia II, quando comparada com a elevada porcentagem de sucesso obtida, em casos de necropulpectomia I (casos de dentes portadores de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente) (Sjogren et al., 1990; Trope et al., 1999; Leonardo, 2005) pode justificar, em parte, essa afirmativa.

Assim, nos casos de necropulpectomia II, um curativo antibacteriano intracanal, entre sessões, poderia complementar a anti-sepsia do sistema de canais radiculares, tornando-o um meio impróprio ao desenvolvimento bacteriano e destruindo aqueles microrganismos não eliminados pela ação do preparo biomecânico (Leonardo, 2005).

Sabe-se que a efetividade de um agente antimicrobiano depende de seu contato direto com os microrganismos e do seu tempo de ação. Por outro lado, a substância química ativa destes agentes, por ação direta ou à distância, pode determinar um efeito benéfico ou prejudicial aos tecidos vivos, devendo ainda permitir a difusão lenta para os tecidos, de moléculas de tamanho pequeno e médio (Abbot et al., 1988, e Abbot et al., 1989).

Por outro lado, o efeito terapêutico do agente antimicrobiano também depende da concentração e do seu estado físico que, por sua vez, é selecionado de acordo com as características histológicas e o metabolismo do tecido exposto, onde o medicamento será colocado. O mesmo seria dizer que a seleção do curativo depende do grau de patologia pulpar.

A preocupação da Endodontia atual, portanto, é a busca de substâncias que reúnam propriedades antibacterianas, antiinflamatórias e indutoras da formação de tecido mineralizado, de tal forma que a inter-relação dessas propriedades proporcione ao medicamento um efeito benéfico sobre os tecidos vivos da região periapical, de cuja integridade depende a reparação tecidual. Dentre essas substâncias, destaca-se o hidróxido de cálcio que, desde sua introdução por Hermann (1920), tem sido a medicação mais estudada, discutida e empregada como curativo de demora entre sessões devido a propriedades que incluem ação antibacteriana (Georgopoulou et al., 1993; Assed, 1994; Leonardo et al., 2000; Shuping et al., 2000; Kvist et al., 2004; Leonardo, 2005; Chu et al., 2006; Manzur et al., 2007), ação anti-exsudativa (Heithersay, 1970; Allard et al., 1987), ação indutora da formação de tecido mineralizado (Schroder, 1985; Leonardo et al., 1997; Leonardo et al., 2006; Almushayt et al., 2006), biocompatibilidade (Silva, 1988; Nelson-Filho et al., 1999; Lu et al., 2006;

Murray et al., 2007), propriedade de dissolução de tecidos necróticos (Hasselgren et al., 1988) e de promover a hidrólise da endotoxina (LPS) bacteriano *in vitro* (Safavi e Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Zuccolotto, 2003; Jiang et al., 2003; Oliveira et al., 2007) e *in vivo* (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

Entre os curativos de demora à base de hidróxido de cálcio disponíveis comercialmente, encontra-se a pasta Calen® (S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - RJ - Brasil), um produto à base de hidróxido de cálcio associado a um veículo viscoso, o polietilenoglicol "400", que mantém o hidróxido de cálcio por mais tempo na área desejada, prolongando sua ação (Leonardo et al., 1993), diminuindo sua solubilização e aumentando sua penetrabilidade na dentina radicular (Leonardo et al., 1993). Além disso, essa pasta apresenta pH em torno de 12,4 (Silva, 1988; Nelson-Filho, 1996), elevada atividade antibacteriana (Leonardo, 2005) e biocompatibilidade (Leonardo et al., 1993; Nelson-Filho et al., 1999).

No entanto, diferentes substâncias têm sido associadas ao hidróxido de cálcio, na tentativa de melhorar algumas de suas propriedades como radiopacidade, viscosidade, escoamento, espectro de ação antimicrobiana, velocidade de dissociação iônica e outras propriedades físico-químicas, favorecendo também as condições clínicas para seu emprego (Basrani et al., 2004).

Entre estas substâncias, destaca-se o digluconato de clorexidina, agente antimicrobiano ativo do grupo das biguanidas, que tem sido pesquisado como uma nova alternativa de associação ao hidróxido de cálcio no uso do curativo de demora (Delgado, 2002; Rabêlo, 2003; Pazelli et al., 2003; Rosenthal et al., 2004; de Rossi et al., 2005; Zerella et al., 2005), visando aumentar sua ação antibacteriana contra microrganismos resistentes (Heling et al., 1992; White et al., 1997; Siqueira et al., 1998; Waltimo et al., 1999; Basrani et al., 2002; Almyroudi et al., 2002; Evans et al., 2003; Podbielski et al., 2003; Basrani et al., 2004; Schäfer e Bössmann, 2005). Embora isoladamente não seja capaz de inativar o LPS bacteriano (Aibel e Stevens, 1999; Buck et al., 2001; Silva et al., 2004; De Oliveira et al., 2007) e de dissolver os tecidos (Zehnder et al., 2003; Naenni et al., 2004; Okino et al., 2004), a clorexidina apresenta substantividade (Jenkins et al., 1988; White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Huang et al., 2000; Lenet et al., 2000; Rosenthal et al., 2004), biocompatibilidade (Southard et al., 1989; Delgado, 2002; Tanomaru-Filho et al., 2002; Dammaschke et al., 2005), baixa toxicidade (Loe et al., 1970; Cannell, 1981; Greenstein et al., 1986; Jeansonne e White, 1994; Yesilsoy et al., 1995) e amplo espectro de ação contra bactérias Gram-

positivas, Gram-negativas, aeróbios, anaeróbios, leveduras e fungos (Heling et al., 1992; Vahdaty et al., 1993; Jeansonne e White, 1994; Schäfer e Bössmann, 2001; Vianna et al., 2004).

Além disso, a clorexidina demonstra ser efetiva mesmo em baixas concentrações contra os microrganismos mais freqüentemente encontrados nas infecções endodônticas (Ohara et al., 1993; D'Arcangelo et al., 1999; Ferreira et al., 2002; Do Amorim et al., 2004). A associação do hidróxido de cálcio à clorexidina resulta em um efeito antimicrobiano sinérgico maior que o uso isolado do hidróxido de cálcio (Waltimo et al., 1999; Evans et al., 2003; Podbielski et al., 2003; Rabêlo, 2003; Zerella et al., 2005). Estudos *in vitro* foram realizados utilizando esta associação sem observar efeitos adversos sobre a solubilidade ou atividade de ambas as substâncias (Geurtsen e Leyhausen, 1997; Fava e Saunders, 1999; Rabêlo, 2003; Podbielski et al., 2003; Basrani et al., 2004).

Pelo exposto, observa-se que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina pode trazer benefícios no tratamento endodôntico de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica visível radiograficamente e, por esse motivo, essa associação tem sido avaliada em estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Basrani et al., 2004; Zerella et al., 2005; De Rossi et al., 2005; Yeung et al., 2007; Ercan et al., 2007; Siqueira et al., 2007; Soares et al., 2007; Yücel et al., 2007).

No entanto, a literatura é conflitante com relação à toxicidade da clorexidina, quando empregada isoladamente. Apesar de alguns autores terem evidenciado que a clorexidina apresenta efeito benéfico (Hirst et al., 1973; Brennan et al., 1986; Gendron et al., 1999; Heitz et al., 2004), outros relatam que, em função da concentração, esta apresenta efeitos tóxicos sobre vários tipos celulares, como eritrócitos humanos (Helgeland et al., 1971), células HeLa (Wennberg, 1980), macrófagos peritoneais de ratos (Knuuttila e Soderling, 1981), fibroblastos gengivais humanos (Babich et al., 1995; Mariotti e Rumpf, 1999) e osteoblastos humanos (Patel et al., 2006).

Tem sido relatado, também, que o uso da clorexidina isoladamente pode afetar, em diferentes graus, a síntese de proteínas (Goldschmidt et al., 1977; Pucher e Daniel, 1992) e a proliferação celular (Lucarotti et al., 1990). Faria et al. (2007) observaram que a clorexidina, em cultura de fibroblastos, ocasiona estresse do retículo endoplasmático (RE), em consequência do acúmulo de proteínas nas cisternas, induz à morte celular por apoptose e/ou necrose via estresse do RE e aumenta a expressão de proteínas indicadoras de estresse celular.

Em função da escassez de trabalhos avaliando a biocompatibilidade e a atividade antimicrobiana da associação do hidróxido de cálcio ao digluconato de clorexidina, em baixa concentração (0,4%), torna-se necessária a realização de pesquisas avaliando essa medicação intracanal, utilizando diferentes metodologias.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®), associada ou não ao digluconato de clorexidina 0,4%, com relação aos seguintes aspectos:

- Viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina, proteínas da matriz não-colágena e formações nodulares de matriz mineralizada, em culturas primárias de células da linhagem osteoblástica;
- Viabilidade celular, propriedades imunoestimuladoras, (dosagem de óxido nítrico) e propriedades antiinflamatórias (dosagem de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 α), em culturas de macrófagos RAW 264.7;
- Atividade antimicrobiana por meio do teste de difusão em ágar, sobre 2 microrganismos indicadores (*Enterococcus faecalis* e *Kocuria rhizophila*); e
- Biocompatibilidade após implantação de tubos de polietileno contendo as pastas no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1) ESTUDO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DAS PROPRIEDADES IMUNOESTIMULADORAS E ANTIINFLAMATÓRIAS

Cultura de macrófagos

Para esse estudo, foi utilizada linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, previamente obtida da Coleção Americana de cultura de células (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal (SBF). Para os ensaios de estimulação *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em dois frascos de cultura celular de 750cm² (Corning Glass Workers - New York - USA) em meio DMEM completo (DMEM-c), à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

Após a formação da monocamada de células, ou seja, após as mesmas atingirem confluência, o meio DMEM-c das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 20ml de solução de gentamicina com PBS, a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida, foram adicionados 15ml de DMEM-c e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (Cell Scraper - Corning Glass Workers - New York - USA). O meio contendo as células foi então retirado e pipetado em dois tubos esterilizados de 50ml. Os frascos foram centrifugados, a 1500rpm, durante 10 minutos, para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10ml de DMEM-c foi adicionado em cada um dos tubos contendo as células.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer, partindo-se da suspensão de 1ml diluída 10 vezes em solução de Azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular e para a contagem total do número de macrófagos.

As células foram então colocadas em placas de cultura de 96 poços (Cell Wells – 25820 – Corning Glass Workers - New York - USA), na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas *overnight* em DMEM-c a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

Grupos Experimentais

Foi avaliada a viabilidade celular e as propriedades imunoestimuladoras e antiinflamatórias, após exposição das células aos seguintes materiais:

Grupo I: Pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen® - S. S. White - RJ - Brasil);

Grupo II: Pasta à base de hidróxido de cálcio e digluconato de clorexidina a 0,4% (pasta experimental);

Grupo III: Hidróxido de cálcio p.a. (Mallinckrodt Baker do Brasil Ltda – São Paulo – SP - Brasil); e

Grupo IV: Digluconato de clorexidina.

Como controle as células foram expostas à endotoxina bacteriana (LPS)(**Grupo V**) e ao meio de cultura DMEM-c (**Grupo VI**).

Concentrações utilizadas

Para os grupos I, II e III, em estudo piloto prévio foram avaliadas as concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097 e 0,048µg do material por ml de meio de cultura, com o objetivo de selecionar aquelas que apresentassem a maior porcentagem de viabilidade celular (ensaio de MTT) e de liberação de óxido nítrico (NO). Tendo em vista os resultados obtidos, todas as concentrações foram escolhidas para a avaliação da viabilidade celular e das propriedades imunoestimuladoras dos materiais dos grupos I, II e III. Com relação ao grupo IV, partindo de uma solução de digluconato de clorexidina a 20% (solução de estoque), no estudo piloto foram avaliadas as concentrações de 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , $2,5 \times 10^{-4}$, $1,2 \times 10^{-4}$, 6×10^{-5} , 3×10^{-5} , $1,5 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-6}\%$, sendo escolhidas as três últimas concentrações para a avaliação da viabilidade celular e das propriedades imunoestimuladoras do grupo IV.

Para o ensaio de atividade antiinflamatória, nos grupos I, II e III foram utilizadas em estudo piloto prévio as concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19µg/ml. Foram selecionadas as concentrações de 25; 12,5 e 6,25µg/ml por serem as que apresentaram os menores valores de liberação de NO. Para o grupo 4, partindo de uma solução de digluconato de clorexidina a 20% (solução de estoque), no estudo piloto foram avaliadas as concentrações de 3×10^{-5} ; $1,5 \times 10^{-5}$; $7,5 \times 10^{-6}$; $3,7 \times 10^{-6}$; $1,8 \times 10^{-6}$ e $9,3 \times 10^{-7}$ µg/ml, sendo selecionadas as concentrações de 3×10^{-5} ; $1,5 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-6}$ µg/ml por apresentarem os menores valores de liberação de NO.

Viabilidade Celular - Ensaio de MTT

A viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 de macrófagos foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma). Alíquotas de MTT a 5 mg/ml em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução a 5% em meio de cultura, por 3 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, foi adicionado 50 µL de SDS 20% em 0,01N de HCl) em cada poço e mantido a temperatura ambiente para a solubilização completa do precipitado formado para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570nm; µQuant, Bio-tek Instruments, Inc). A viabilidade celular nos grupos I, II, III e IV foi expressa em porcentagem e comparada aos grupos V e VI (controles).

Propriedades Imunoestimuladoras – Determinação de Nitrito

A quantidade de nitrito presente no meio de cultura foi mensurada como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess, adicionando 100µl do meio de cultura (sem vermelho de fenol) a igual volume do Reagente de Griess. Em seguida, foi efetuada a incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos e posterior leitura em Leitor de Elisa com absorbância de 540nm. O meio de cultura fresco foi utilizado como *blank* em todos os experimentos. A quantidade de nitrito (NO₂⁻) nas amostras foi obtida por meio de curva padrão de diluição seriada de NaNO₂. O ensaio foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em µM.

Atividade Antiinflamatória – Determinação de Nitrito e Ensaio de dosagem de Citocinas (TNF-α e IL-1α)

A atividade antiinflamatória dos materiais dos Grupos I, II, III e IV foi avaliada por meio do pré-tratamento da cultura de células com os mesmos nas diferentes concentrações já previamente descritas. Após 2 horas de contato dos materiais com as células, as amostras foram estimuladas com endotoxina bacteriana (LPS) de *Escherichia coli* (Lipopolisaccharide B *E. coli* 0111:B4 – Product number L4130 – Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), na concentração de 2µg de LPS por ml de PBS (estímulo inflamatório). As amostras foram incubadas, durante 24 horas a 37°C com 95% de ar e 5% de CO₂ sendo quantificado, a seguir, o nitrito acumulado no meio de cultura, como um indicador da produção de NO, como descrito anteriormente. As citocinas TNF-α e IL-1α foram quantificadas no sobrenadante pelo Método Imuno-

Enzimático (ELISA). As concentrações das citocinas foram determinadas em comparação às curvas-padrão obtidas de valores conhecidos de TNF- α e de IL-1 α recombinantes camundongos. As densidades ópticas (DO) foram determinadas por meio da utilização de leitor de ELISA (μ Quant, Bio-tek Instruments, Inc) a 450nm. O ensaio foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em pg/ml.

Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA), utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

2) ESTUDO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA LINHAGEM OSTEoblástica - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR, CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL, ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA, PROTEÍNAS DA MATRIZ NÃO-COLÁGENA E FORMAÇÕES NODULARES DE MATRIZ MINERALIZADA

Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Para obtenção de células da linhagem osteoblástica, foi utilizado o modelo experimental de cultura primária de calvárias de ratos recém-nascidos (Bellows et al., 1986; Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998).

Ratos Wistar de 2-4 dias de vida pós-natal foram trazidos do Biotério Central do Campus da USP-Ribeirão Preto em caixa de plástico contendo maravalha, aproximadamente 1 hora antes de serem decapitados. Este procedimento foi realizado logo após a limpeza da pele entre a cabeça e o dorso do animal com iodopovidona tintura (Riodeine®), sendo utilizadas lâminas novas para cada 5 animais, tendo sido utilizados 10 a 15 animais por cultura primária. Após a decapitação, a calvária foi removida com tesoura cirúrgica pequena para, em seguida, ser fragmentada, visando o isolamento das células osteogênicas por meio de digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e collagenase tipo II a 0,1% (Gibco, Invitrogen), como descrito previamente (Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998; De Oliveira et al., 2003; De Oliveira e Nanci, 2004). Foram utilizadas células isoladas na 2ª e 3ª digestões, de 15 e 25 minutos, respectivamente, uma vez que aquelas obtidas na primeira digestão de 5 minutos não são capazes de desenvolver formações nodulares de matriz mineralizada (*woven bone-like nodules*) (Bellows et al., 1986; Bellows e Aubin, 1989; Owen et al., 1990). As células enzimaticamente isoladas, em suspensão, foram contadas na câmara de Neubauer e plaqueadas sobre as superfícies de Thermanox® na densidade de 2×10^4 células/poço, em placas de poliestireno de 24 poços. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 14 dias em Meio Essencial Mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5µg/ml de ácido ascórbico (Sigma) e 50µg/ml de gentamicina (Gibco, Invitrogen), à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Essas condições experimentais favorecem a diferenciação osteoblástica *in vitro* e a mineralização da matriz extracelular em formações nodulares,

de multicamadas de células. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi retirado dos poços e foram adicionados os seguintes materiais:

- **Grupo I:** meio de cultura, sem adição de nenhum material.
- **Grupo II:** meio de cultura contendo 25µg/ml de pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen® - S. S. White, RJ, Brasil); e
- **Grupo III:** meio de cultura contendo 25µg/ml de pasta experimental à base de hidróxido de cálcio (Calen® - S. S. White, RJ, Brasil) com Digluconato de Clorexidina a 0,4% (Farmoderm – Farmácia de Manipulação, SP, Brasil).

O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase. Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em quadruplicata (n=4).

Fluorescência Direta e Imunofluorescência Indireta para a Localização de proteínas da matriz extracelular não-colágena

Deteção histoquímica e quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada

Nos períodos de 3, 7 e 14 dias, as culturas celulares foram submetidas à fluorescência direta e imunofluorescência indireta para localização de proteínas da matriz não-colágena, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Análises realizadas em cultura primária de células da linhagem osteoblástica nos períodos de 3, 7 e 14 dias

PERÍODO	FIXAÇÃO	MÉTODO	MARCAÇÃO
3 dias	Solução de Formaldeído (paraformaldeído a 96%)	Fluorescência Direta	✓Faloidina + Alexa Fluor 488 ✓DAPI
7 dias	Solução de Formaldeído (paraformaldeído a 96%)	Imunofluorescência Indireta + Fluorescência Direta	✓Anticorpo primário para sialoproteína óssea (anti-BSP) ✓ Anticorpo secundário + Alexa Fluor 594 (vermelho) ✓DAPI
14 dias	Álcool Etílico a 70%	Imunofluorescência Indireta + Fluorescência Direta	✓DAPI ✓Anticorpo primário para sialoproteína óssea (anti-BSP) ✓Anticorpo primário para osteopontina (anti-OPN) ✓Anticorpo secundário + Alexa Fluor 488 (verde) ✓ Vermelho de Alizarina

Nos períodos experimentais de 3 e 7 dias, as células de cada grupo (I, II e III) foram fixadas por 10 minutos à temperatura ambiente, em solução de formaldeído (paraformaldeído a 96%, Acros Organics, Geel, Bélgica) a 4% PBS a 0,1M, pH 7,2 e submetidas a diferentes marcações para a localização de proteínas da matriz extracelular não colágena. No período experimental de 14 dias, as células foram fixadas por 1 hora a 4°C, em solução de álcool etílico a 70%.

Aos 3 dias, por meio de Fluorescência Direta, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 (Acros Organics) a 0,5% em PBS por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PBS por 30 minutos, seguida de exposição à solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para visualização das células e de seus limites pela detecção da proteína citoesquelética actina, ubiqüitária. As células foram também marcadas com dihidrocloro 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI, fluorescência azul; Molecular Probes; 1:300) em água bidestilada, para observação dos núcleos celulares.

Aos 7 dias, além das marcações para DAPI, como descrito anteriormente, as culturas foram submetidas a protocolo para imunomarcção pelo Método da Imunofluorescência Indireta (De Oliveira e Nanci, 2004), por meio da marcação para a sialoproteína óssea. Anticorpos primários monoclonais para sialoproteína óssea (anti-BSP, 1:200, WV1D1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank - DSHB, Iowa City, IA, EUA) foram utilizados, seguidos de anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes). As incubações dos anticorpos primários e secundários foram realizadas em atmosfera úmida à temperatura ambiente por 60 minutos. A substituição dos anticorpos primários por PBS foi usada como controle adicional. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS, por 5 minutos cada.

Aos 14 dias foram efetuadas marcações para DAPI e sialoproteína óssea, como descrito previamente, e para osteopontina. Anticorpos primários monoclonais para osteopontina (anti-OPN, 1:800, MPIIB10-1, DSHB) foram utilizados, seguidos de anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes). As incubações dos anticorpos primários e secundários foram realizadas em atmosfera úmida à temperatura ambiente por 60 minutos. A substituição dos anticorpos primários por PBS foi usada como controle. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS, por 5 minutos cada.

Nos períodos de 3, 7 e 14 dias, após as marcações das proteínas os discos de Thermanox® foram montados diretamente em lâminas de vidro e, em seguida, sobre a superfície contendo células, foi montada uma lamínula de vidro circular de 12mm de diâmetro (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) com meio de montagem *anti-fade* (Prolong, Molecular Probes). As amostras foram examinadas em epiluminação utilizando microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Leica, Bensheim, Alemanha), com objetivas N Plan de 10X/0,25 e 20X/0,40, acoplado a uma câmera digital Leica DC 300F, 1.3 megapixel CCD (Leica). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop (versão 7.0.1, Adobe Systems) para ajustes em dimensões, brilho e contraste, sobreposições de fluorescências vermelha, verde e azul (modo de mesclagem: clarear) e montagem das pranchas. Os resultados foram obtidos por meio de descrição qualitativa de imagens representativas de cada grupo (I, II e III).

Ainda no tempo experimental de 14 dias, as culturas primárias foram coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos, para identificação de depósitos de cálcio em áreas de matriz mineralizada.

Para a detecção microscópica, os espécimes foram fotografados com câmera digital (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8) e observados e fotografados em epiluminação em microscópio de fluorescência Leica DMLB (Leica). A proporção de áreas marcadas com vermelho de Alizarina foi determinada a partir das imagens macroscópicas das culturas aos 14 dias, obtidas digitalmente com câmara de alta resolução (Canon EOS Digital, 8.0 megapixels, com lente macro 50), usando o software Image Tool (University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX, USA), de acordo com Rosa e Beloti (2003), com as imagens submetidas à transformação binária. Os resultados foram obtidos por meio de descrição qualitativa de imagens representativas de cada grupo (I, II e III).

Viabilidade celular – Ensaio de MTT

Nos períodos de 3, 7 e 10 dias, a viabilidade celular foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Alíquotas de MTT na concentração de 5mg/ml em tampão fosfato (PBS) foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar

atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1ml de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1ml de solução de isopropanol ácido (100ml de isopropanol e 134μL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200μl foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570nm; μQuanti, Bio-tek Instruments, Inc). A viabilidade celular nos diferentes grupos (I, II e III) foi expressa pelo valor das densidades ópticas (DO) obtidas por meio do espectofotômetro.

Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total nas culturas dos grupos I, II e III foi determinado no 7º e 10º dias de cultura, pelo método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951). A solução para dosagem da proteína total foi extraída inicialmente de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma) por 30 minutos e misturada na proporção 1:1 com solução de Lowry (Sigma) por 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi avaliada a 680nm utilizando espectrofotômetro (Cecil CE 3021, Cambridge, Reino Unido). O conteúdo de proteína total foi calculado por meio de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em μg/ml.

Atividade de fosfatase alcalina

Aos 7 e 10 dias, a atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total dos grupos I, II e III, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Inicialmente, 50μl de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5ml de tampão dietanolamina a 0,3M, pH 10,1, por 2 minutos a 37°C. À solução foi então acrescentada uma alíquota de 50μL de lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2ml de Na₂CO₃ a 0,09M e NaOH a 0,25M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Cecil CE 3021, Cambridge, Reino Unido) utilizando comprimento de onda de 590nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4μmol de timolftaleína/h/ml. Os dados foram expressos como atividade de fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína).

Método do *Fast red* para detecção da atividade de fosfatase alcalina *in situ*

No período de 7 dias, o meio de cultura foi retirado dos poços e as culturas, lavadas com mistura de solução de Hanks (9,8g/L, Sigma) e NaHCO₃ Hybrimax (350mg/l, Sigma), aquecida a 37°C. Após esse procedimento adicionou-se, em cada poço, 1 ml de solução tampão Tris a 120mM (Sigma), pH 8,4, contendo *Fast red TR* a 1,8mM (Sigma), naftol-ASMX-fosfato a 0,9mM (Sigma) e dimetil (1:9, Merck) por 30 minutos em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os poços foram então lavados com PBS a 0,1M, pH 7,2, e as culturas, marcadas com DAPI, como previamente descrito, para posterior visualização por epifluorescência. Os resultados foram obtidos por meio de descrição qualitativa de imagens representativas de cada grupo (I, II e III).

Análise estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Comparações da viabilidade celular, do conteúdo de proteína total, da quantidade de fosfatase alcalina e a proporção de áreas marcadas com vermelho de Alizarina foram efetuadas por meio do Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados, quando não especificados, foram apresentados como a média ± desvio padrão.

3) ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Foi avaliada a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da pasta Calen®+Clorexidina 0,4%, do hidróxido de cálcio p.a. (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, EUA) em água destilada, da pasta Calen® e do digluconato de clorexidina a 0,4%, frente aos seguintes microrganismos indicadores:

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541), que apresenta elevada resistência intrínseca; e

- *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), anteriormente denominado *Micrococcus luteus*, que apresenta reduzida resistência intrínseca.

Para o teste de difusão em ágar foi empregado o método do poço, utilizando o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* – TSA (Difco) para os *Enterococcus faecalis* e o meio *Mueller Hinton* – MH (Difco) para o *Kocuria rhizophila*, pela técnica de camada dupla (Grove e Randal, 1955).

No fluxo laminar, a camada base (*base layer*) foi obtida vertendo-se 12ml de meio de cultura TSA ou MH, a 50°C, em placas de Petri de 20X100mm. Após solidificação da camada base, adicionou-se a camada *seed* (*seed layer*), composta de 8mL de meio de cultura TSA ou MH, a 50°C, com 10⁶ unidades formadoras de colônia (ufc) por ml do inóculo original (escala 1 de McFarland para o *Enterococcus faecalis* e escala 0,5 de McFarland para o *Kocuria rhizophila*) de cada um dos microrganismos indicadores. O estudo foi realizado em quadruplicata, ou seja, foram utilizadas quatro placas para cada microrganismo avaliado.

Após solidificação, foram realizadas 6 perfurações (poços) equidistantes na superfície dos meios de cultura, com 5mm de diâmetro e com profundidade atingindo as camadas *base* e *seed*. Cada poço foi preenchido com os materiais a serem testados, seguida de pré-incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. A seguir, as placas de MH foram incubadas em aerobiose e as placas de TSA em microaerofilia (sistema de chama de vela), a 37°C, por 24 horas.

Decorridas 24 horas, a fim de facilitar a avaliação, foi realizada a otimização das placas, por meio da colocação de uma camada de 10mL de gel de TTC (cloreto de trifenil tetrazólio – Sigma) sobre a superfície da cultura. Após 30 minutos, foi efetuada a mensuração dos halos de inibição do crescimento microbiano, em milímetros, com régua, sob luz refletida.

Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA), utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

4) ESTUDO EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS - RESPOSTA EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO

Foram utilizados 70 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 15 a 20 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, os quais foram divididos em 8 grupos. Cada animal recebeu um implante na região dorsal contendo:

Grupo I – experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta Calen® acrescida de digluconato de clorexidina a 0,4% – Período de 7 dias;

Grupo II – experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta Calen® acrescida de digluconato de clorexidina a 0,4% – Período de 21 dias;

Grupo III – experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta Calen® acrescida de digluconato de clorexidina a 0,4% – Período de 63 dias.

Grupo IV – experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta UltraCal™ (hidróxido de cálcio e digluconato de clorexidina a 2% - Ultradent Product, Inc. – USA) – Período de 7 dias

Grupo V – experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta UltraCal™ (Ultradent Product, Inc. – USA) – Período de 21 dias;

Grupo VI - experimental (10 animais): 1 tubo polietileno contendo a pasta UltraCal™ (Ultradent Product, Inc. – USA) – Período de 63 dias;

Grupo VII – controle (5 animais): 1 tubo polietileno vazio – Período de 7 dias; e

Grupo VIII – controle (5 animais): 1 tubo polietileno vazio – Período de 21 dias.

A tabela 2 apresenta a distribuição dos diferentes grupos.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos

GRUPOS	DESCRIÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS	PERÍODOS
I	Pasta Calen ® acrescida de digluconato de clorexidina a 0.4%	10	7 dias
II	Pasta Calen ® acrescida de digluconato de clorexidina a 0.4%	10	21 dias
III	Pasta Calen ® acrescida de digluconato de clorexidina a 0.4%	10	62 dias
IV	Pasta UltraCal ™	10	7 dias
V	Pasta UltraCal ™	10	21 dias
VI	Pasta UltraCal ™	10	63 dias
VII	Tubo Vazio	5	7 dias
VIII	Tubo Vazio	5	21 dias

Preparo dos Tubos de Polietileno

Foram utilizados tubos de polietileno de 2mm de diâmetro interno, os quais tiveram uma extremidade fechada com o auxílio de uma pinça clínica aquecida e cortados com 1cm de comprimento. Após serem esterilizados por óxido de etileno, os tubos foram preenchidos com os materiais a serem testados.

Procedimento Operatório

Para o ato cirúrgico, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (1ml/100g de peso corporal do animal), injetado intraperitonealmente. Em seguida, foram realizadas a tricotomia da pele do dorso e a anti-sepsia da região com gluconato de clorexidina a 1%.

O procedimento cirúrgico consistiu em uma incisão de 1cm, efetuada com tesoura cirúrgica, na região lombar do dorso do animal, seguida de divulsão com tesoura romba. Após posicionar o tubo no interior do tecido, com auxílio de pinça clínica, a pele foi suturada com fio de seda (Vicryl 4-0 – Ethicon – Johnson & Johnson).

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, durante os períodos experimentais, com alimentação e água *ad libitum*.

Ao final de cada um dos períodos experimentais, 10 animais de cada grupo experimental (7, 21 e 63 dias) e 5 animais de cada grupo controle (7 e 21 dias) foram novamente anestesiados, para remoção da porção do tecido conjuntivo subcutâneo, pele e tubo de polietileno. Em seguida, os animais foram mortos por sobredose anestésica. O tecido removido foi fixado em formol a 10% e submetido ao processamento histotécnico de rotina.

Processamento histotécnico

As peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, ou seja, incluídas em parafina, sendo retirados os tubos de polietileno, e cortadas seriadamente com uma espessura de 5 micrometros. Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina.

Análise microscópica

Os espécimes foram analisados em microscópio de luz binocular Olympus utilizando de objetivas 4, 10, 40 e 100X. No tecido periférico ao material testado os fenômenos observados e os critérios adotados para mensurá-los de forma semi-quantitativa e qualitativa foram os seguintes:

A) Fibrosamento:

Levou-se em consideração o número e a densidade de fibras colágenas de permeio às células periféricas localizadas no tecido reacional circunjacente ao material testado. O fibrosamento foi classificado em 3 graus de severidade, com valores numéricos correspondentes em escores:

- Escore 0: ausência de fibrosamento;
- Escore 1 (fibrosamento leve): quando as fibras colágenas apresentavam-se individualizadas tal qual um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular;
- Escore 2 (fibrosamento moderado): quando em algumas áreas as fibras colágenas apresentavam-se individualizadas, mas com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílica sem formações lineares e onduladas típicas das mesmas; e
- Escore 3 (fibrosamento intenso): quando as fibras colágenas apresentavam-se em meio a uma matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, não permitindo uma individualização das mesmas.

B) Espessura:

Considerou-se o número de células fibroblásticas e macrofágicas associadas e justapostas à superfície do material em direção ao tecido conjuntivo periférico. Esta mensuração foi realizada no maior eixo de espessura do tecido reacional. A espessura foi classificada em 3 graus de severidade com valores numéricos correspondentes em:

- Escore 0: espessura normal;
- Escore 1 (espessura levemente ampliada): quando observava-se uma estratificação de 1 a 3 células;
- Escore 2 (espessura moderadamente ampliada): quando a estratificação era de 4 as 10 células; e
- Escore 3 (espessura intensamente ampliada): quando a estratificação celular era maior que 10 camadas.

C) Infiltrado inflamatório:

Avaliou-se a concentração de polimorfonucleares tipo neutrófilos de permeio ao tecido reacional peri-material. Esta concentração foi classificada em 3 graus de severidade com valores numéricos correspondentes em:

- Escore 0: ausência de infiltrado inflamatório;
- Escore 1 (infiltrado inflamatório leve): quando observava-se 1 a 10 neutrófilos no tecido reacional;
- Escore 2 (infiltrado inflamatório moderado): quando observava-se 11 a 20 neutrófilos no tecido reacional; e
- Escore 3 (infiltrado inflamatório intenso): quando observava-se mais de 21 neutrófilos no tecido reacional.

D) Outros achados:

Registrou-se ainda a ocorrência de fenômenos eventualmente encontrados como extravasamento de material além da abertura do tubo implantado, abscedção e calcificação distrófica nos tecidos circunjacentes ao material testado.

Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA), utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1) ESTUDO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DAS PROPRIEDADES IMUNOESTIMULADORAS E ANTIINFLAMATÓRIAS

Efeito dos materiais na viabilidade celular – Ensaio MTT

Os resultados obtidos demonstraram que tanto as pastas à base de hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio associado à clorexidina, como o hidróxido de cálcio p.a. não se apresentaram tóxicos à cultura de células RAW 264.7 de macrófagos de camundongos, por meio do Ensaio de MTT (Figura 1A). Por outro lado, a clorexidina não apresentou citotoxicidade à cultura de células RAW 264.7 nas concentrações de $7,5 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-5}$ e 3×10^{-5} %, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle ($p > 0,05$) (Figura 1B).

Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações dos materiais (A: Calen®, Calen®+CHX e hidróxido de cálcio p.a.; B: CHX) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT. Diferenças significantes em relação ao grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de *.

Propriedades Imunoestimuladoras – Determinação de Nitrito

Para avaliar o efeito dos diferentes materiais na produção de óxido nítrico (NO), a quantidade de nitrito (NO_2^-) foi mensurada no meio de cultura, uma vez que este representa um produto final estável de NO, por meio da utilização do reagente de Griess. Como demonstrado nas figuras 2, 3, 4 e 5, o tratamento das células com os materiais testados não promoveu aumento significativo na produção de NO em células RAW 267.4. Após análise estatística, não foi evidenciada diferença significativa entre as concentrações 0,048; 0,097; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas nos Grupos II (Pasta Calen® + CHX) e III (Hidróxido de cálcio p.a.) e as concentrações $7,5 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-5}$ e 3×10^{-5} , utilizadas no Grupo IV (CHX) e o Grupo VI (controle - células não tratadas) ($p > 0,05$). Em relação ao Grupo I (Pasta Calen®), somente a maior concentração avaliada (12,5 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou diferença estatística significativa em relação ao Grupo VI (controle-meio de cultura) ($p < 0,01$). Todas as concentrações utilizadas nos Grupos I, II, III e IV apresentaram diferença significativa com relação ao Grupo V (controle – LPS) ($p < 0,001$).

Figura 2 - Efeito da Pasta Calen® na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 3 - Efeito da Pasta Calen®+CHX na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 4 - Efeito do Hidróxido de cálcio p.a. na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 5 - Efeito da clorexidina na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Atividade antiinflamatória – Determinação de Nitrito e Ensaio de Citocinas (TNF- α e IL-1)

O efeito antiinflamatório dos materiais em estudo foi avaliado por meio do tratamento prévio das células com os mesmos, seguido da exposição ao LPS (estímulo inflamatório) e avaliação da cinética de liberação das citocinas TNF- α e IL-1 α e do óxido nítrico (NO), os quais contribuem para manter a ativação de macrófagos.

As figuras 6 a 17 apresentam os resultados da liberação de TNF- α e IL-1 α e de NO, respectivamente, para os diferentes materiais avaliados.

Figura 6 - Efeito da Pasta Calen® na liberação de TNF- α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 7 - Efeito da Pasta Calen®+CHX na liberação de TNF-α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 8 - Efeito do Hidróxido de cálcio p.a. na liberação de TNF-α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 9 - Efeito da clorexidina na liberação de TNF- α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 10 - Efeito da Pasta Calen® na liberação de IL-1 α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente. NC: não considerado.

Figura 11 - Efeito da Pasta Calen® + CHX na liberação de IL-1α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 12 - Efeito do Hidróxido de cálcio p.a. na liberação de IL-1α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 13 - Efeito da clorexidina na liberação de IL-1 α em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 14 - Efeito da Pasta Calen® na liberação de NO em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente. NC: não considerado.

Figura 15 - Efeito da Pasta Calen® + CHX na liberação de NO em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 16 - Efeito do Hidróxido de cálcio p.a. na liberação de NO em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Figura 17 - Efeito da clorexidina na liberação de NO em células RAW 264.7. Diferenças significantes em relação aos grupos controle, macrófagos incubados somente em meio de cultura e incubados com LPS, foram identificadas por meio de * e #, respectivamente.

Como demonstrado nas figuras 6 e 7, o tratamento das células com os materiais dos Grupos I (Pasta Calen®) e II (Calen® + CHX) promoveu um aumento na liberação de TNF- α com relação ao Grupo V (controle – LPS) quando utilizados nas concentrações de 6,25 e 12,5 μ g/mL, seguido de decréscimo na liberação (concentração 25 μ g/mL). A análise estatística desses dados evidenciou diferença significativa entre todas as concentrações utilizadas (6,25; 12,5 e 25 μ g/mL) de ambos os Grupos (I e II) em relação ao Grupo VI (controle – células não tratadas) ($p < 0,001$), exceto para a concentração de 25 μ g/mL, utilizada no Grupo I ($p > 0,05$). Já a comparação dos resultados de todas as concentrações utilizadas com o Grupo V (controle – LPS) evidenciou diferença significativa ($p < 0,001$). Destaca-se o grande decréscimo na liberação de TNF- α promovido pelo pré-tratamento das células com os materiais dos Grupos I e II (Pasta Calen® e Pasta Calen® + CHX, respectivamente) na concentração de 25 μ g/mL, indicando seu potencial antiinflamatório.

De forma semelhante à descrita anteriormente para a citocina TNF- α , como demonstrado nas figuras 10 e 11, o tratamento das células com os materiais dos Grupos I (Pasta Calen®) e II (Calen® + CHX) promoveu um padrão de liberação de IL-1 α maior quando esses materiais foram utilizados nas concentrações de 6,25 e 12,5 μ g/mL, seguido de decréscimo na liberação na concentração de 25 μ g/mL. Da mesma forma, deve-se destacar o grande decréscimo na liberação de IL-1 α em relação ao

Grupo V (controle – LPS) ($p < 0,001$) promovido pelo pré-tratamento das células com os materiais do Grupo II (Pasta Calen® + CHX) na concentração de 25µg/mL, indicando seu potencial antiinflamatório. O mesmo não pôde ser considerado com relação à concentração de 25µg/mL do Grupo I (Pasta Calen®), uma vez que a intensa diminuição da liberação de IL-1 α foi atribuída ao elevado grau de morte celular, evidenciado pelo Ensaio de MTT realizado concomitante a esse estudo (Figura 18).

Em relação ao Grupo III (Hidróxido de Cálcio p.a.), a Figura 8 mostra que o material utilizado promoveu aumento na liberação de TNF- α com um padrão dose-dependente, sendo todas as concentrações utilizadas (6,25; 12,5 e 25µg/mL) diferentes estatisticamente em relação ao Grupo VI (controle - células não tratadas) ($p < 0,001$), indicando ausência de potencial antiinflamatório. Da mesma forma, como demonstrado na Figura 12, o material utilizado no Grupo III (Hidróxido de cálcio p.a.) promoveu aumento na liberação de IL-1 α , indicando ausência de potencial antiinflamatório. Já no Grupo IV (CHX), o material utilizado promoveu aumento na liberação de TNF- α quando utilizado nas concentrações de $7,5 \times 10^{-6}$ e $1,5 \times 10^{-5}\%$, seguido de decréscimo na liberação na concentração de $3 \times 10^{-5}\%$ (Figura 9). Entretanto, esse decréscimo promovido pela maior concentração de clorexidina não foi diferente estatisticamente em relação ao Grupo V (controle – LPS), refletindo apenas uma tendência dessa concentração apresentar potencial antiinflamatório ($p > 0,05$). De maneira semelhante, a resposta observada frente ao material do Grupo IV (CHX), em relação à liberação da citocina IL-1 α , seguiu o padrão de aumento da liberação de IL-1 α nas concentrações de $7,5 \times 10^{-6}$ e $1,5 \times 10^{-5}\%$, seguido de decréscimo na liberação na concentração de $3 \times 10^{-5}\%$ (Figura 13). Entretanto, o decréscimo promovido pela maior concentração de clorexidina na liberação de IL-1 α se mostrou estatisticamente significativo em relação ao Grupo V (controle – LPS), indicando um potencial antiinflamatório dessa material, nesta concentração ($p < 0,001$).

Em relação ao NO, todos os materiais promoveram inibição na produção, com um padrão dose-dependente (Figuras 14 a 15). Os materiais dos Grupos I (Pasta Calen®), II (Pasta Calen® + CHX), III (Hidróxido de Cálcio p.a.) e IV (CHX) se comportaram de maneira bastante semelhante, uma vez que promoveram diminuição na liberação de NO, seguindo um padrão dose-resposta (Figuras 14 a 15). Os valores observados em todas as concentrações (6,25; 12,5 e 25µg/mL) desses grupos foram menores e estatisticamente diferentes quando comparados aos valores do Grupo V (controle – LPS) ($p < 0,001$), exceto na concentração de 25µg/mL do Grupo I (Figura 14), uma vez que a diminuição na liberação de NO esteve relacionada à

elevada porcentagem de morte celular evidenciada pelo Ensaio de MTT realizado simultaneamente à presente avaliação (Figura 18).

É importante ressaltar que a inibição na liberação de NO, IL-1 α e TNF- α em células RAW 264.7 pelos materiais testados não esteve atribuída à sua citotoxicidade, promovendo morte celular, como observado por meio do Ensaio de MTT, exceto nos casos específicos citados anteriormente (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Efeito dos diferentes materiais (Pasta Calen®; Pasta Calen® + CHX; Hidróxido de cálcio p.a.) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT.

Figura 19 - Efeito da clorexidina em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT.

2) ESTUDO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA LINHAGEM OSTEoblástica - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR, DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL, ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA, PROTEÍNAS DA MATRIZ NÃO-COLÁGENA E FORMAÇÕES NODULARES DE MATRIZ MINERALIZADA

Fluorescência Direta e Imunofluorescência Indireta para a Localização de proteínas da matriz extracelular não-colágena

Deteccção histoquímica e quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada

Aspectos de caracterização das culturas osteogênicas foram comuns aos grupos experimentais Controle (Grupo I), Calen® (Grupo II) e Calen®+CHX (Grupo III), razão pela qual estão descritos conjuntamente a seguir.

A análise morfológica por epifluorescência de culturas marcadas com faloidina e DAPI revelou que, nos diferentes grupos experimentais, as células estavam aderidas e espreiadas sobre as lamínulas de Thermanox, exibindo fenótipo predominantemente poligonal aos 3 dias (Figura 20, A-C). No tempo de 7 dias, ao final da fase proliferativa, as culturas estavam em confluência, mostrando em algumas áreas o início de formação de multicamadas celulares. Essas áreas foram coradas em vermelho pelo método do *Fast red* (Figura 20, D-F), indicando atividade de fosfatase alcalina *in situ*, e suas células expressavam sialoproteína óssea (Figura 20, G-I), com padrão de marcação predominantemente perinuclear e em pontos dispersos pelo citoplasma. Nos três grupos, aos 14 dias, áreas com formações nodulares de matriz mineralizada coravam-se com vermelho de Alizarina, sendo que as células associadas a essas formações expressavam sialoproteína óssea e osteopontina (Figura 20, J-O).

Figura 20- Aspectos de culturas osteogênicas crescidas sobre Thermanox na presença de meio de cultura controle (A, D, G, J e M) e contendo as pastas Calen (B, E, H, K e N) e Calen+CHX (C, F, I, L e O), nos tempos de 3 (A-C), 7 (D-I) e 14 (J-O) dias. Em 3 dias, epifluorescência de culturas marcadas com faloidina (verde) e DAPI (azul) mostrou que as células estavam aderidas e espaiadas sobre o substrato nos três grupos (A-C), com morfologia predominantemente poligonal. Em 7 dias, as culturas apresentavam-se em confluência, sendo que áreas de início de formação de multicamadas exibiam atividade de fosfatase alcalina (áreas coradas em vermelho pelo método do *Fast red*, observadas por luz transmitida em D-F e por epifluorescência, nos detalhes em D-F) e expressão de sialoproteína óssea (áreas de fluorescência vermelha em G-I). Aos 14 dias, áreas com formações de matriz calcificada, coradas com vermelho de Alizarina (observadas por epifluorescência em J-L e macroscopicamente, em M-O), ocorriam em todos os grupos, associadas às quais se observavam marcações para sialoproteína óssea e osteopontina (fluorescência verde em J-L e detalhe em J, respectivamente). A barra de escala representa 100 µm para A-C e G-L, 200 µm para D-F e detalhe em J, 300 µm para detalhes em D-F e 2,3 mm para M-O. BSP=sialoproteína óssea e ARS=vermelho de Alizarina.

A análise estatística da proporção de áreas coradas pelo vermelho de Alizarina, aos 14 dias de cultura, não evidenciou diferença estatística entre os três grupos avaliados (controle, pasta Calen® e pasta Calen®+CHX) ($p>0,05$) (Figura 21). Entretanto, numericamente observou-se uma tendência de maiores valores no Grupo III (pasta Calen®+CHX).

Figura 21 - Proporção de áreas coradas pelo vermelho de Alizarina, aos 14 dias, em culturas primárias de células da linhagem osteoblástica cultivadas com diferentes materiais (Grupo II - Pasta Calen® e Grupo III - Pasta Calen® associada à CHX) em relação ao controle (Grupo I - células cultivadas em meio de cultura).

Efeito dos Materiais na Viabilidade celular – Ensaio de MTT

Como observado na Figura 22, os valores de densidades ópticas obtidas, após leitura em espectrofotômetro, demonstraram que as pastas à base de hidróxido de cálcio (Grupo II) e hidróxido de cálcio associado à clorexidina (Grupo III), na concentração avaliada (25µg/ml), não se apresentaram tóxicas à cultura primária de células da linhagem osteoblástica, por meio do Ensaio de MTT, em relação aos valores obtidos no grupo controle (Grupo I), evidenciando que as pastas não alteraram a viabilidade celular. A análise estatística permitiu evidenciar que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p>0,05$).

Figura 22 - Viabilidade celular (densidade óptica) em culturas primárias de células da linhagem osteoblástica cultivadas com diferentes materiais (Grupo II - Pasta Calen® e Grupo III - Pasta Calen® associada à CHX) em relação ao controle (Grupo I - células cultivadas em meio de cultura).

Atividade de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo de proteína total

Aos 7 e 10 dias, a atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total dos grupos I, II e III, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato. A atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μmol de timolftaleína/h/ml, sendo os dados expressos como atividade de fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína).

Nos dois períodos analisados, a atividade de fosfatase alcalina determinada foi semelhante nos três grupos analisados. Como observado ainda na Figura 23, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de fosfatase alcalina dos Grupos II (Pasta Calen®) e III (Pasta Calen®+CHX) em relação ao Grupo I (controle), assim como não houve diferença entre os grupos II e III entre si ($p > 0,05$).

Figura 23 - Atividade de fosfatase alcalina, aos 7 e 10 dias, em culturas primárias de células da linhagem osteoblástica cultivadas com diferentes materiais (Grupo II - Pasta Calen® e Grupo III – Pasta Calen® associada à CHX) em relação ao controle (Grupo I – células cultivadas em meio de cultura).

Em relação ao conteúdo de proteína total, como demonstrado na Figura 24, não foi observada diferença entre os Grupos I (controle), II (Pasta Calen®) e III (Pasta Pasta Calen® + CHX), determinado no 7º dia de cultura ($p>0,05$). O conteúdo de proteína total no 7º dia variou de 373,43 a 397,38µg/ml.

Da mesma forma, no 10º dia de cultura (Figura 24), não foi observada diferença entre os Grupos I (controle), II (Pasta Calen®) e III (Pasta Pasta Calen® + CHX) ($p>0,05$). O conteúdo de proteína total no 10º dia variou de 85,14 a 109,69µg/ml.

Figura 24 - Conteúdo de proteína total (µg/ml), aos 7 e 10 dias, em culturas primárias de células da linhagem osteoblástica cultivadas com diferentes materiais (Grupo II - Pasta Calen® e Grupo III – Pasta Calen® associada à CHX) em relação ao controle (Grupo I – células cultivadas em meio de cultura).

A tabela 3 sumariza os resultados obtidos no estudo em cultura primária de células da linhagem osteoblástica.

Tabela 3 - Análise quantitativa da viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e da proporção de áreas coradas com vermelho de Alizarina em culturas osteogênicas crescidas sobre Thermanox no grupos I (controle), II (Calen®) e III (Calen®+CHX)

Parâmetros	PERÍODOS (DIAS)	GRUPO I (CONTROLE)	GRUPO II (CALEN ®)	GRUPO III (CALEN ® +CHX)	TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
Viabilidade Celular (DO)	3	0,21±0,02	0,22±0,02	0,20±0,01	NS
	7	0,64±0,05	0,64±0,05	0,68±0,05	NS
	10	0,50±0,12	0,58±0,11	0,54±0,17	NS
Conteúdo de Proteína Total (µg/ml)	7	386,74±9,92	385,50±7,7	388,12±6,62	NS
	10	97,31±10,31	2 98,75±4,97	93,01±4,57	NS
Atividade de ALP (µmol timolftaleína/h/mg)	7	0,45±0,12	0,63±0,16	0,46±0,13	NS
	10	31,55±4,31	20,44±8,98	21,15±5,58	NS
Áreas coradas com vermelho de Alizarina (%)	14	7,2±1,2	8,17±1,3	11,1±3,2	NS

Dados representativos dos valores médios ± desvio padrão. NS= Não significante (p>0,05).

3) ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os resultados da atividade antimicrobiana da pasta Calen®+CHX, da pasta Calen®, do hidróxido de cálcio p.a. em água destilada e do digluconato de clorexidina a 0,4%, avaliada pelo teste de difusão em ágar frente aos 2 microrganismos indicadores (*Enterococcus faecalis* e *Kocuria rhizophila*), estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana (halos em mm) da Pasta Calen®+CHX, da pasta Calen®, do hidróxido de cálcio p.a. em água destilada e do digluconato de clorexidina a 0,4% - teste de difusão em ágar.

Placa	Materiais							
	Calen ® +CHX		Calen ®		Hidróxido de cálcio + água destilada		Digluconato de CHX a 0,4%	
	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>K.</i> <i>rhizophila</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>K.</i> <i>rhizophila</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>K.</i> <i>rhizophila</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>K.</i> <i>rhizophila</i>
1	12	20	10	19	10	21	16	28
2	11	20	10	19	10	21	16	28
3	11	20	10	20	10	22	17	30
4	11	20	9	17	10	22	16	30

As figuras 25 e 26 ilustram os halos de inibição do crescimento microbiano observados com os diferentes materiais.

Figura 25 – Halos de inibição do crescimento microbiano, empregando *E. faecalis* (A) e *K. rhizophila* (B) como microrganismos indicadores.

Figura 26 – Halos de inibição do crescimento microbiano, empregando *K. rhizophila*, após otimização do meio de cultura.

As figuras 27 e 28 apresentam os halos de inibição do crescimento do *E. faecalis*, em milímetros, observados nos materiais avaliados.

Figura 27 – Halos de inibição do crescimento do *E. faecalis* observados nos materiais avaliados.

Figura 28 – Halos de inibição do crescimento do *K. rhizophila* observados nos materiais avaliados.

De acordo com a análise estatística (teste de Kruskal Wallis), houve diferença significativa entre os materiais empregados ($p=0,0027$ para *E. faecalis* e $p=0,0029$ para *K. rhizophila*).

Quando comparados dois a dois (Teste de Dunn), com relação ao *E. faecalis*, observou-se diferença significativa apenas quando comparou-se a clorexidina a 0,4% com a pasta Calen® ($p < 0,05\%$) e com o hidróxido de cálcio em água destilada ($p < 0,05\%$).

Por outro lado, com relação ao *K. rhizophila*, a comparação dos materiais dois a dois evidenciou diferença apenas entre a clorexidina a 0,4% e a pasta Calen® ($p < 0,05\%$).

4) ESTUDO EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS - RESPOSTA EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO

Descrição da Análise Microscópica Qualitativa

Grupo I – Calen®+CHX – 7 dias (Figura 29 G-I)

Na interface tecido-material testado observou-se fibroblastos bem individualizados e paralelos à superfície. Em alguns macrófagos notou-se a fagocitose de partículas granulares finas e basofílicas do material testado. De permeio notou-se uma quantidade muito pequena de neutrófilos. O tecido reacional apresentou-se bem organizado para um período de 7 dias. O material nas porções remanescentes apresentou-se hialino e basofílico com formação de pequenas esferas de superfície irregular e tamanhos variáveis na sua matriz estrutural.

Grupo II – Calen®+CHX – 21 dias (Figura 29 J-L)

O fibrosamento na interface com o material foi muito discreto e associado a pequena espessura com presença eventual de neutrófilos. O tecido reacional se aproximava do aspecto de tecido conjuntivo fibroso normal. Em alguns espécimes, macrófagos foram observados na interface e em contato direto com o material, o mesmo sendo observado com as células gigantes multinucleadas inflamatórias do tipo corpo estranho. No interior dos macrófagos, apenas em algumas células, notou-se a presença de finas granulações basofílicas correspondentes ao material testado.

Grupo III – Calen®+CHX – 63 dias (Figura 29 M-O)

O tecido circunjacente e reacional apresentava fibrosamento discreto e assemelhava-se ao tecido conjuntivo fibroso normal, caracterizando-se por uma organização capsular. Na interface com o material observou-se, com frequência, a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias do tipo corpo estranho. A espessura do tecido reacional foi muito pequena e sem infiltração neutrofílica.

Grupo IV – Ultracal^{TM} – 7 dias (Figura 30 A-C)

O material apresentou-se com pequenas partículas múltiplas, irregulares e basofílicas na interface com o tecido reacional circunjacente. Morfologicamente sugeriu-se que a superfície do material se apresentava dissolvida, provavelmente pelas enzimas do exsudato e/ou das células inflamatórias. O fibrosamento variava de discreto a moderado, mas em um tecido reacional mais espesso pelo exsudato mais exuberante denotado pelos espaços negativos entre os macrófagos e fibroblastos, muito embora em alguns espécimes o tecido se apresentasse bem organizado. Os macrófagos apresentaram-se predominantemente ovóides e tumefatos com seu citoplasma rico em partículas do material. As células gigantes multinucleadas inflamatórias do tipo corpo estranho eram eventuais na interface com o material testado. Em 5 dos espécimes houve extravasamento de material para além da abertura do tubo implantado, sugerindo maior fluidez do mesmo.

Grupo V – Ultracal^{TM} – 21 dias (Figura 30 D-I)

A espessura do tecido circunjacente reacional revelava-se grande e determinada pela grande quantidade de macrófagos, muito embora fibroblastos

estivessem presentes também em grande número. Os vasos estavam dilatados e, em alguns espécimes, o número de neutrófilos eram grau 2, denotando uma moderada atividade destas células, ainda como uma atividade residual da fase aguda que provavelmente se prolongou. As fibras colágenas em algumas áreas não estavam individualizadas, estabelecendo-se áreas hialinas na matriz extracelular. Muitos macrófagos apresentavam partículas do material em seu citoplasma. O extravasamento do material testado ocorreu em 3 dos 5 espécimes examinados.

Grupo VI – Ultracal™ – 63 dias (Figura 30 J-O)

Imediatamente na interface com o material testado notou-se grau 2 de fibrosamento do tecido reacional. Havia um infiltrado inflamatório neutrofílico associado a grande quantidade de macrófagos e vasos congestos, além de exsudato ainda abundante. Estas características sugeriram que ainda havia uma agressão residual do material testado, mesmo 63 dias após sua implantação. Assim, a espessura do tecido reacional ainda era tal como aos 21 dias e até maior que aos 7 dias de experimento com o mesmo material. Células gigantes multinucleadas inflamatórias foram observadas na superfície do material. Em 4 espécimes houve extravasamento do material para além da abertura do tubo, induzindo reação granulomatosa do tipo corpo estranho.

Grupo VII – Tubo Vazio – 7 dias (Figura 29 A-C)

A reação tecidual na abertura vazia do tubo estava representada por presença marcante de fibroblastos permeados por macrófagos e eventuais neutrófilos. Não se detectou células gigantes multinucleadas inflamatórias nesta região. Contrastando com esta área de extremidade vazia, nas paredes laterais do tubo de polietileno a resposta tecidual apresentava-se bem menos exuberante, com poucas células gigantes e macrófagos na sua superfície, bem como tecido reacional bem próximo à morfologia do tecido conjuntivo fibroso quanto ao seu grau de fibrosamento e organização estrutural.

Grupo VIII – Tubo Vazio – 21 dias (Figura 29 D-F)

O tecido reacional na extremidade aberta do tubo apresentou-se menos exuberante em sua espessura, quando comparada com o período de 7 dias, mas o grau de fibrosamento foi menor. Os macrófagos presentes estavam associados a eventuais neutrófilos e células gigantes multinucleadas inflamatórias. Comparativamente às paredes laterais do tubo implantado, a resposta na abertura vazia do tubo era muito maior em sua espessura e celularidade.

Figura 29 - Aspectos microscópicos da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente ao tubo de polietileno vazio e ao Calen + Clorexidina alojado em tubos de polietileno nos diferentes períodos experimentais:

Aos 7 dias (em A, B, C) o tecido reacional na abertura de tubos vazios era moderadamente espesso, ricamente celularizado e pobre em exsudato, às vezes delimitado pela camada muscular esquelética (em A), com fibrosamento discreto. Os macrófagos apresentavam-se de permeio aos numerosos fibroblastos (em B e C). Eventuais neutrófilos puderam ser observados (em C). (H.E.; 5X em A, 10X em B e 40X em C).

Aos 21 dias (em D, E e F) a espessura do tecido reacional na abertura de tubos vazios ainda era moderada com neutrófilos distribuídos difusamente (em E e F). O grau de fibrosamento era discreto e os macrófagos representavam as células predominantes entremeados pelos fibroblastos. Na superfície interna do tecido reacional nota-se células gigantes multinucleadas inflamatórias (em F). (H.E.; 5X em D, 10X em E, 40X em F).

Aos 7 dias (em G, H, I) o tecido reacional frente ao Calen + Clorexidina alojado em tubos de polietileno era pouco espesso (em H), pobre em exsudato e rico em macrófagos e fibroblastos jovens com fibrosamento discreto (em I). Neutrófilos foram observados entre os macrófagos e fibroblastos (em I). (H.E.; 5X em G, 10X em H e 40X em I).

Aos 21 dias (em J, K, L) a espessura do tecido reacional frente ao Calen + Clorexidina alojado em tubos de polietileno era discreta (em J e K) com muito poucos neutrófilos (em L). O grau de fibrosamento era discreto e os macrófagos predominavam entremeados pelos fibroblastos. Na interface com o material, havia células gigantes multinucleadas inflamatórias (em L). (H.E.; 5X em J, 10X em K, 40X em L).

Aos 63 dias (em M, N, O) no tecido reacional frente ao Calen + Clorexidina, alojado em tubos de polietileno, os feixes de fibras colágenas estavam distribuídos tal como na interface da parede lateral do tubo com o tecido conjuntivo normal (em M e N). A espessura era pequena, sem espaços negativos (em N e O). Eventualmente alguns neutrófilos estavam presentes (em O). Na interface com o material notaram-se pequenas células gigantes multinucleadas inflamatórias (em O). Em M destaca-se a presença da epiderme, derme e camada muscular subcutânea do camundongo. (H.E.; 5X em M, 10X em N, 40X em O).

Figura 30 – Aspectos microscópicos da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente ao Ultracal alojado em tubos de polietileno nos diferentes períodos experimentais:

Aos 7 dias (em A, B, C) o tecido reacional era espesso e rico em exsudato, as vezes delimitado pela camada muscular esquelética (em A), com fibrosamento muito discreto. Os macrófagos ovóides apresentavam tumefactos com microvacúolos sugerindo fagocitose do material com acúmulo de material em seu citoplasma (em B e C). Eventuais neutrófilos podem ser observados de permeio aos macrófagos e fibroblastos (em C). (H.E.; 5X em A, 10X em B e 40X em C).

Aos 21 dias (em D a I) a espessura do tecido reacional ainda era grande com neutrófilos distribuídos difusamente (em F e I). O grau de fibrosamento era discreto e os macrófagos representavam as células predominantes entremeados pelos fibroblastos. (H.E.; 5X em D e G, 10X em E e H, 40X em F e I).

Aos 63 dias (em J a O) os feixes de fibras colágenas estavam entremeados e separados por espaços negativos representando o exsudato (em L) e por infiltrado macrofágico permeado ainda por eventuais neutrófilos (em O). Vasos congestos também foram observados (em N e O), bem como extravasamento de material além da abertura do tubo (em M e N). (H.E.; 5X em J e M, 10X em K e N, 40X em L e O).

Análise Estatística

A análise dos escores obtidos após a avaliação dos parâmetros (Fibrosamento, Espessura e Infiltrado Inflamatório) pode ser observada nas Figuras 31, 32 e 33.

Figura 31 - Porcentagem de escores referente ao Fibrosamento nos diferentes grupos avaliados. Diferenças estatísticas significantes estão representadas pelo *.

Em relação ao Fibrosamento, a análise estatística não demonstrou diferença significativa, no período de 7 dias, entre os grupos avaliados. No período de 21 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos II (Calen®+CHX) e V (UltraCal™) ($p < 0,05$) e entre os Grupos V e VIII (Controle) ($p < 0,05$). Já no período de 63 dias, a análise dos dados demonstrou diferença estatística entre os Grupos III (Calen®+CHX) e VI (UltraCal™) ($p < 0,05$).

Figura 32 - Porcentagem de escores referente à Espessura nos diferentes grupos avaliados. Diferenças estatísticas significantes estão representadas pelo *.

Em relação à Espessura de tecido, como demonstrado na Figura 32, no período de 7 dias, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre os Grupos I (Calen®+CHX) e 4 (UltraCal™) ($p<0,05$). No período de 21 dias, houve diferença significativa entre os Grupos II (Calen®+CHX) e V (UltraCal™) ($p<0,05$) e entre os Grupos V (UltraCal™) e VIII (Controle) ($p<0,05$). Já no período de 63 dias, pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre os Grupos III (Calen®+CHX) e VI (UltraCal™) ($p<0,05$).

Figura 33 - Porcentagem de escores referente ao Infiltrado Inflamatório nos diferentes grupos avaliados. Diferenças estatísticas significantes estão representadas pelo *.

Como demonstrado na Figura 33, em relação ao Infiltrado Inflamatório, a análise estatística não demonstrou diferença significativa entre nenhum dos Grupos avaliados, nos períodos de 7 e 21 dias ($p>0,05$). Já no período de 63 dias, houve diferença significativa entre os Grupos III e VI ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

1) ESTUDO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DAS PROPRIEDADES IMUNOESTIMULADORAS E ANTIINFLAMATÓRIAS

No presente estudo foram utilizadas células da linhagem macrofágica de camundongos RAW 264.7, já empregadas em estudos anteriores (Brune et al., 1998; Kim et al., 2003; Jiang et al., 2003).

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT após exposição das mesmas a diferentes concentrações das pastas Calen® e Calen®+CHX a 0,4%. Nesse ensaio, amplamente utilizado em estudos dessa natureza (Camp e About, 2003; Zhang et al., 2003; Huang et al., 2004; Costa et al., 2007; Huang et al., 2007), a viabilidade celular foi de 100%, em todas as concentrações avaliadas (de 0,048 a 25µg/ml), em ambos os materiais. Assim, pode-se inferir que, embora a clorexidina empregada isoladamente possa apresentar citotoxicidade em cultura de células (Pucher e Daniel, 1992; Wilken et al., 2001; Patel et al., 2006; Cabral e Fernandes, 2007), a associação da clorexidina a 0,4% à pasta Calen, nesse estudo, não ocasionou morte celular ($p>0,05$).

Com o objetivo de avaliar a propriedade imunoestimuladora da associação da pasta Calen® à clorexidina a 0,4%, a produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada, após exposição das células a esse material. Sabe-se que o NO é uma molécula diatômica produzida em células de mamíferos pela enzima NO-sintase, que catalisa a conversão da L-arginina em NO (Marletta, 1993; Abu-Soud et al., 1997). Trata-se de um radical livre gasoso, considerado como um dos mediadores da inflamação tecidual (Moncada et al., 1991; Moilanen e Vapaatalo, 1995), mediando não somente atividades pró-inflamatórias, mas também sinais para a regulação do crescimento e diferenciação celular (Teixeira et al., 2005).

O NO desempenha duas funções sobre as células: função regulatória e citotoxicidade. Nas funções regulatórias, é produzido em quantidades reduzidas, sob condições fisiológicas, mediando o relaxamento de vasos, o controle da adesão e a agregação de plaquetas e neutrófilos, estando também envolvido na neurotransmissão (Bredt e Snyder, 1994). No entanto, funções citotóxicas podem ser observadas quando o NO é produzido em grande quantidade (Bellows et al., 2006) por macrófagos, hepatócitos e outras células, após exposição a citocinas ou a outros

produtos bacterianos (Moncada et al., 1991). Além disso, o NO está envolvido no processo de reabsorção óssea periapical (Takeichi et al., 1999) e desempenha papel fundamental na regulação da reação inflamatória periapical, associado a outras citocinas (Hama et al., 2006).

Os resultados do presente estudo permitiram observar que as pastas Calen® e Calen®+clorexidina a 0,4%, em geral não ocasionaram imunoestimulação, ou seja, não elevaram a produção de NO, em comparação ao controle ($p>0,05$) não sendo, portanto, citotóxicas. Por outro lado, o LPS (controle) se comportou como um potente agente inflamatório e estimulador da produção de NO, como já salientado por vários autores (Blix e Helgeland, 1998; Bellows et al., 2006).

Paralelamente, na presença de diferentes estímulos, como o LPS e materiais odontológicos, macrófagos e outros tipos celulares produzem citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Dewhirst et al., 1985; Bertolini et al., 1986; Barkordar et al., 1999; Perrier et al., 2002), as quais estão envolvidas no desenvolvimento, manutenção e reparação das lesões periapicais (Stashenko et al., 1998).

Têm-se hipotetizado que inibidores específicos da produção de citocinas poderiam ser utilizados como agentes farmacológicos no tratamento de dentes com lesão periapical (Hama et al., 2006). Por essa razão, no presente trabalho foi realizado ensaio de atividade antiinflamatória, por meio do pré-tratamento das células com diferentes materiais, incluindo as pastas Calen® e Calen®+CHX a 0,4%, seguida de exposição das células a um estímulo inflamatório (LPS) e dosagem posterior de NO, IL-1 α e TNF- α .

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho observou-se que a pasta Calen®+CHX a 0,4% apresentou atividade antiinflamatória na maior concentração utilizada, ou seja, de 25 μ g/ml, inibindo a produção de NO, IL-1 α e TNF- α . Em função da ausência de trabalhos publicados avaliando os efeitos celulares dessa associação na produção de citocinas, a comparação dos resultados por nós obtidos com a literatura específica torna-se impossibilitada.

2) ESTUDO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA LINHAGEM OSTEoblástica - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR, CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL, ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA, PROTEÍNAS DA MATRIZ NÃO-COLÁGENA E FORMAÇÕES NODULARES DE MATRIZ MINERALIZADA

A resposta tecidual frente à utilização de pastas à base de hidróxido de cálcio no tratamento endodôntico tem sido objeto de investigação nas últimas décadas. Os resultados de estudos utilizando diferentes modelos experimentais animais mostram que a exposição dos tecidos periapicais a esse material favorece diferentes aspectos do processo de reparação tecidual, incluindo a neoformação de cemento e do osso alveolar (Leonardo et al., 1994; Silva et al., 2002; Leonardo et al., 2003; Onçag et al., 2006; Ercan et al., 2007).

Para avaliar a influência da adição de clorexidina à pasta à base de hidróxido de cálcio no processo de formação óssea (de matriz mineralizada) *in vitro*, foi utilizado o modelo de cultura primária de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos recém-nascidos (Bellows et al., 1986; Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998; De Oliveira et al., 2007).

Modelos de cultura de células são largamente utilizados para o estudo, em ambiente controlado, de eventos moleculares, celulares e teciduais que ocorrem durante o processo de osteogênese em resposta à presença de diferentes materiais (Puleo e Nanci, 1999). Foram bem estabelecidos para o modelo utilizado no presente estudo o procedimento para isolamento das células, as condições de cultura, a sequência de diferenciação osteoblástica e a expressão temporal de proteínas da matriz extracelular (Stein e Lian, 1993). A digestão de fragmentos dos ossos de calvária em desenvolvimento por tripsina e colagenase permite isolar uma população celular heterogênea composta por células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos diferenciados, osteócitos e até mesmo fibroblastos (Bellows et al., 1986; Stein e Lian, 1993; Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998; De Oliveira et al., 2003). Nas condições de cultura utilizadas, inicia-se a formação de nódulos microscópicos de matriz mineralizada entre 10 e 14 dias, semelhantes a formações de tecido ósseo imaturo ("*woven bone-like*"), os quais resultam da expansão clonal de células osteoprogenitoras e do processo de diferenciação osteoblástica *in vitro* (Bellows et al., 1986; Bellows e Aubin, 1989; Nanci et al., 1996).

Três fases principais caracterizam a progressão de culturas osteogênicas: adesão e proliferação celular, diferenciação celular, e maturação e mineralização da matriz extracelular (Owen et al., 1990; Aubin, 2000). Os osteoblastos

diferenciados *in vitro* são capazes de sintetizar e secretar colágeno tipo I, fosfatase alcalina e outras proteínas da matriz extracelular não-colágena, incluindo a osteonectina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (Owen et al., 1990; Sodek et al., 1991; Sodek e Cheifetz, 2000; Aubin, 1998, 2000). Todas as células da linhagem osteoblástica expressam colágeno tipo I e fosfatase alcalina, porém a expressão de moléculas não-colágenas é variável. Apesar disso, essas proteínas da matriz óssea são utilizadas como marcadores da diferenciação osteoblástica (Sodek e Cheifetz, 2000).

No presente estudo, foram utilizados como marcadores de diferenciação osteoblástica as moléculas fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e osteopontina. Níveis elevados de atividade de fosfatase alcalina são observados no início do processo de mineralização da matriz extracelular, o que está de acordo com a hipótese de que essa enzima é essencial para o início do processo de mineralização, mas não para sua progressão (Bellows et al., 1991). Enquanto que a sialoproteína óssea é considerada marcador inicial da diferenciação osteoblástica, a osteopontina exibe picos de expressão por volta do 5º dia de cultura e em 14 dias, sendo por isso considerada marcador tardio, como a osteocalcina. Essas moléculas não-colágenas controlam a mineralização da matriz: a sialoproteína óssea tem função principal na nucleação de cristais de apatitas na matriz colágena (Ganss et al., 1999; Tye et al., 2003; Tye et al., 2005) e a osteopontina inibe o crescimento dos cristais (Sodek et al., 2000).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Calen®, Calen®+CHX e controle em relação aos parâmetros analisados (viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e proporção de áreas nodulares de matriz mineralizada), sendo que nos três grupos as culturas primárias exibiram fenótipo osteogênico aos 14 dias. Esses resultados indicam que a exposição a meio de cultura contendo pasta Calen® na concentração utilizada não altera o potencial osteogênico das culturas primárias. No entanto, o aumento não estatisticamente significativo de áreas de mineralização no grupo Calen®+CHX, da ordem de 35%, interpretado apenas como tendência, indica a necessidade de se avaliar esse parâmetro com maior número de repetições ou mesmo em outras condições e/ou modelos experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Apesar de a pasta Calen® não apresentar exclusivamente hidróxido de cálcio em sua composição (Leonardo et al., 1993), a ausência de avaliações deste material utilizando modelos experimentais de osteogênese *in vitro* permite comparar os resultados do presente estudo apenas àqueles avaliando a resposta de culturas

osteoblásticas expostas a composições de hidróxido de cálcio. Neste sentido, Murakami et al. (1997) relataram que o hidróxido de cálcio promoveu o aumento na síntese de colágeno e de proteínas, após a sua incorporação em esferas de PMMA (polimetilmetacrilato), durante a osteogênese. Da mesma forma, Jaunberzins et al. (2000) descreveram que culturas primárias de calvária de ratos expostas ao hidróxido de cálcio apresentaram aumento na expressão de proteínas colágenas e não-colágenas da matriz extracelular.

Embora a literatura apresente estudos relacionados ao efeito isolado da clorexidina em diversos tipos celulares (Helgeland et al., 1971; Hirst et al., 1973; Wennberg, 1980; Brennan et al., 1986; Babich et al., 1995; Mariotti e Rumpf, 1999; Heltz et al., 2004; Patel et al., 2006), com resultados conflitantes, não há trabalhos descrevendo o efeito da associação clorexidina e hidróxido de cálcio, especialmente em culturas osteogênicas e avaliando os parâmetros observados no presente estudo. Dessa forma, a comparação dos resultados aqui apresentados com a literatura específica também fica impossibilitada.

3) ATIVIDADE ANTIMICROBIANA – TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Para se obter materiais que sejam efetivos na redução/eliminação da infecção bacteriana presente no sistema de canais radiculares de dentes decíduos e permanentes com necrose pulpar, com ou sem lesão periapical visível radiograficamente, torna-se necessário avaliar o espectro de ação antimicrobiana dos mesmos. Com essa finalidade, o teste *in vitro* de difusão em ágar tem sido amplamente empregado (Estrela et al., 2001; Lin et al., 2003; Haenni et al., 2003; Basrani et al., 2003; Amorim et al., 2006; Gomes et al., 2006; Soares et al., 2007; Neelakantan et al., 2007).

Como outros métodos *in vitro*, o teste de difusão em ágar depende do tamanho das moléculas, da solubilidade e da difusão dos materiais a serem testados no ágar, o que interfere nos halos de inibição (Gomes et al., 2002). Deve-se ressaltar, também, que no teste de difusão em ágar, frequentemente utilizado para avaliar a eficácia de agentes antimicrobianos, o efeito medido (halos de inibição do crescimento microbiano) é dependente da capacidade da substância antimicrobiana testada de se difundir no ágar. Barbosa et al. (1997) sugeriram que o hidróxido de cálcio poderia apresentar eficácia reduzida sobre *E. faecalis* devido à sua baixa difusão ou tamponamento pelo ágar. Assim, os resultados de estudos *in vitro*, geralmente não devem ser extrapolados diretamente para as condições clínicas de tratamento.

Além disso, *in vivo*, a eficácia dos materiais é geralmente reduzida pela capacidade tampão da dentina. Também, a quantidade de medicação colocada no canal radicular é geralmente menor que a usada em estudos *in vitro* e a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas, sob a forma de biofilme, dificilmente é reproduzida *in vitro* (Gomes et al., 2006).

O *E. faecalis*, contrariamente à *K. rizophila*, é um microrganismo facultativo considerado como um dos mais resistentes às medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio (Bystrom et al., 1985; Orstavik e Haapasalo, 1990; Heling et al., 1992; Peciulienė et al., 2000; Pinheiro et al., 2003; Basrani et al., 2003) e está frequentemente associado com insucessos pós-tratamento endodôntico (Molander et al., 1990; Sundqvist et al., 1998; Lin et al., 2003; Stuart et al., 2006). Adicionalmente, tolera pH elevado, variando de 9 a 11 (Gomes et al., 2006), sendo a bactéria entérica mais comumente isolada de canais radiculares nas infecções primárias ou em retratamentos, onde aparecem como monoinfecção (Siren et al., 1997). Segundo Bystrom et al. (1985), o *E. faecalis* apresenta a capacidade de sobreviver em

ambientes com escassez de nutrientes, capacidade de invadir túbulos dentinários e de aderir ao colágeno na presença de soro humano.

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de tratamento eficaz contra o *E. faecalis* (Ohara et al., 1993), o uso desse microrganismo em estudos *in vitro* e *in vivo*, é relevante. Além disso, o *E. faecalis* é de cultivo relativamente fácil e tem sido empregado em inúmeros estudos (Estrela et al., 2001; Lin et al., 2003; Basrani et al., 2003; Haenni et al., 2003; Amorim et al., 2006; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2006; Neelakantan et al., 2007).

Embora o hidróxido de cálcio apresente atividade antimicrobiana (Georgopoulou et al., 1993; Assed, 1994; Leonardo et al., 2000; Shuping et al., 2000; Kvist et al., 2004; Leonardo, 2005; Chu et al., 2006; Manzur et al., 2007), este não é igualmente eficaz contra todos os microrganismos encontrados nos canais radiculares (Gomes et al., 2002). Assim, a adição da clorexidina, teoricamente, poderia aumentar o espectro de ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio, tornando-o mais eficaz contra microrganismos como o *E. faecalis*. Além disso, essa associação provê substantividade à pasta (Tanomaru-Filho et al., 2002; Soares et al., 2007).

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo aspecto, cujo mecanismo de ação é relacionado à estrutura molecular catiônica das biguanidas. A molécula catiônica sofre adesão à parede celular carregada negativamente e causa extravasamento de componentes intracelulares. Em baixas concentrações é bactericida, enquanto que em altas concentrações causa coagulação e precipitação de citoplasma bacteriano, sendo bactericida (Lin et al., 2003).

No entanto, a análise dos dados numéricos da Tabela 4 permite observar que, no presente estudo, o digluconato de clorexidina apresentou a maior atividade antimicrobiana (halos de inibição do crescimento microbiano variando de 16 a 17mm) para o *E. faecalis*, embora sem diferença estatisticamente significativa, e que a atividade antimicrobiana da clorexidina sofreu redução quando esta foi associada ao hidróxido de cálcio (halos de 11 a 12mm). Além disso, a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sofreu elevação com essa associação (halos de 9 a 10mm quando empregado isoladamente e halos de 11 a 12mm quando associado à clorexidina). Os resultados numéricos do presente estudo evidenciaram apenas uma tendência de maior atividade antimicrobiana da pasta Calen®-CHX em relação à pasta Calen® isoladamente, embora sem diferença estatisticamente significativa.

Por outro lado, no presente trabalho não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre a atividade antimicrobiana das pastas

Calen® e Calen®-CHX sobre *E. faecalis* e *K. rizophila*. Concordamos com Haenni et al. (2003), que relataram que a adição da clorexidina a 0,5% ao hidróxido de cálcio não elevou a eficácia antimicrobiana sobre *E. faecalis*, pelo teste de difusão em ágar, tendo em vista que observaram halos de inibição sobre maiores com o uso da clorexidina a 0,5% empregada isoladamente ($15,2 \pm 0,3$ mm) que quando esta foi associada ao hidróxido de cálcio ($13,8 \pm 0,3$ mm). Em 2001, Estrela et al. também não evidenciaram efeito antimicrobiano adicional quando associaram o hidróxido de cálcio à clorexidina, porém mostraram que o hidróxido de cálcio não perdeu a sua atividade antibacteriana nessa associação. Em 2006, Ercan et al. compararam a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio p.a., associado ou não à clorexidina a 2%, sobre *E. faecalis in vitro*, concluindo que a clorexidina isoladamente foi significativamente mais eficaz que quando associada ao hidróxido de cálcio.

A esse respeito, questiona-se: *Por que a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio é mantida e a da clorexidina é diminuída, quando da associação desses dois materiais?* Possivelmente, a resposta esteja relacionada ao fato de que as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio são diretamente relacionadas ao pH (Bystrom et al., 1985; Evans et al., 2002), ou seja, à sua capacidade de liberação de íons hidroxila. Segundo Haenni et al. (2003), o pH não é alterado com a adição da clorexidina, pois o hidróxido de cálcio é uma substância altamente alcalina. Assim, a combinação desses dois materiais não reflete em alterações na liberação iônica, mantendo o pH alcalino e, conseqüentemente, mantendo a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio. No entanto, segundo Gomes et al. (2006), a redução do efeito antimicrobiano da clorexidina ocorre quando esta é associada ao hidróxido de cálcio, fato este provavelmente resultante da precipitação da clorexidina, que ocorre em pH elevado.

Em 2003, Haenni et al. relataram que a associação da clorexidina ao hidróxido de cálcio resultou em uma inibição da atividade antimicrobiana da clorexidina, provavelmente em função do elevado pH, que ocasiona deprotonação da biguanida em pH superior a 10 e, por essa razão, uma redução na solubilidade e mudanças na interação com as superfícies bacterianas, devido a alterações na carga da molécula (Jones et al., 2000).

Pelo exposto, estudos adicionais do ponto de vista físico-químico e antimicrobiano, são necessários a fim de elucidar o mecanismo da possível perda de efetividade da clorexidina, quando da sua associação com o hidróxido de cálcio.

4) ESTUDO EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS – RESPOSTA EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO

Do ponto de vista clínico, independente do material empregado, o curativo de demora ideal para dentes com necrose pulpar e lesão periapical deve apresentar atividade antibacteriana e, sobretudo, ser biocompatível, a fim de favorecer o reparo e não provocar irritação adicional aos tecidos periapicais. Embora o hidróxido de cálcio seja um material que apresenta compatibilidade biológica (Silva, 1988; Nelson-Filho et al., 1999; Leonardo, 2005; Lu et al., 2006; Almushayt et al., 2006), as diferentes substâncias adicionadas a ele, no sentido de melhorar suas condições clínicas de uso e suas propriedades antimicrobianas podem alterar, em muito, a resposta tecidual após sua utilização.

A biocompatibilidade dos materiais à base de hidróxido de cálcio tem sido avaliada em tecido conjuntivo subcutâneo, utilizando geralmente ratos e camundongos como animais de experimentação (Mitchell e Shankwalker, 1958; Holland et al., 1971; Catanzaro-Guimarães e Alle, 1974; Kawakami et al., 1987; Özbas e Dindar, 1996; Nelson-Filho et al., 1999; Delgado, 2002). Esses estudos têm sido efetuados por meio de implantes dos materiais no tecido subcutâneo de ratos e cobaias, de diferentes maneiras, tais como em tubos de dentina humana (Maurício, 1980), tubos de teflon (Economides et al., 1995), esponjas cirúrgicas (Binnie e Mitchell, 1973), em lamínulas de vidro (Birman et al., 1990;), diretamente no tecido ósseo (Bhambhani e Bolanos, 1993) e tecido conjuntivo (Kawakami et al., 1987) ou pela injeção subcutânea direta de soluções do material (Silva, 1995; Nelson-Filho, 1996; Delgado, 2002; Onçag et al., 2003). No presente estudo implantamos os materiais no tecido conjuntivo de camundongos isogênicos acondicionados em tubos de polietileno, como preconizado por diferentes autores (Holland et al., 1971; Catanzaro-Guimarães e Alle, 1974; Özbas e Dindar, 1996; Teixeira et al., 2006; Cintra et al., 2006).

Sabe-se que a pasta Calen®, à base de hidróxido de cálcio, reduz a agressividade inicial característica da alcalinidade (área de necrose superficial) quando em contato com tecidos vivos, devido ao veículo empregado (polietileno glicol 400) o qual libera H⁺, que se une com o grupo hidroxila (OH⁻) do hidróxido de cálcio neutralizando a reação, justificando em parte a sua biocompatibilidade (Nelson Filho et al., 1999). Por outro lado, vários autores enfatizam as propriedades irritantes da clorexidina empregada isoladamente, quando em contato com o tecido conjuntivo

(Yesilsoy et al., 1995; Delgado, 2002; Onçag et al., 2003; Faria et al., 2007). Assim, em função da escassez de estudos avaliando a biocompatibilidade da associação hidróxido de cálcio/clorexidina, nos propusemos a avaliar a biocompatibilidade de duas pastas à base de hidróxido de cálcio associadas a diferentes concentrações de clorexidina: a Calen®+CHX a 0,4% e a Ultracal (hidróxido de cálcio e clorexidina a 2%).

No presente estudo, com relação aos parâmetros avaliados (fibrosamento, espessura tecidual e infiltrado inflamatório), a pasta Calen®+CHX a 0,4% apresentou resultados microscópicos semelhantes aos do grupo controle ($p < 0,05$), nos períodos de 7 e 21 dias, com retorno à normalidade aos 63 dias. Assim, os resultados obtidos com a associação da pasta Calen® à CHX a 0,4% foram semelhantes aos descritos na literatura com o uso da pasta Calen pura, quando em contato com tecidos vivos (Silva, 1988; Nelson-Filho et al., 1999; Delgado, 2002; Leonardo, 2005). A reação foi caracterizada inicialmente (7 dias) pela presença de infiltrado neutrofílico leve, macrófagos esparsos fagocitando o material e tecido reacional organizado. Aos 21 e 63 dias o tecido reacional já se encontrava praticamente normal, demonstrando que a pasta permitiu o reparo tecidual.

Esses resultados são concordantes com os obtidos por Delgado (2002), que avaliou a biocompatibilidade das pastas Calen®, Calen®+CHX a 1% e da CHX a 1%, 24 horas, 7 dias e 14 dias após injeção no tecido conjuntivo subcutâneo da pata de ratos. Os resultados evidenciaram que a CHX a 1% apresentou elevado potencial irritante e incompatibilidade tecidual, em todos os períodos experimentais. Por outro lado, as pastas Calen® e Calen®+CHX a 1,0% mostraram ser biocompatíveis e permitiram o reparo tecidual nos períodos finais do estudo.

No entanto, a resposta tecidual da clorexidina associada ao hidróxido de cálcio parece ser dose-dependente, tendo em vista que, no presente estudo, os resultados obtidos com o uso da pasta Ultracal (hidróxido de cálcio associado à CHX a 2%) foram insatisfatórios. Nos períodos de 7, 21 e 63 dias, em geral, a pasta Ultracal apresentou piores resultados que a pasta Calen®+CHX a 0,4%, com relação aos parâmetros avaliados (fibrosamento, espessura tecidual e infiltrado inflamatório).

Assim, concordamos com Schilder e Amsterdam, (1959), quando afirmaram que o uso de uma droga não depende apenas da sua compatibilidade biológica, mas também da sua correta utilização, na concentração adequada.

Pelo exposto, os resultados do presente estudo evidenciaram que, de maneira geral a adição do digluconato de clorexidina a 0,4% à pasta Calen® propiciou

a manutenção da viabilidade celular, permitiu a ocorrência de mineralização e apresentou atividade antimicrobiana, exibindo resposta tecidual adequada.

No entanto, estudos adicionais em outros níveis de pesquisa devem ser realizados, previamente à indicação dessa pasta para uso clínico.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos pôde-se concluir que a adição da clorexidina a 0,4% à pasta Calen®:

- Não alterou a viabilidade celular, o conteúdo de proteína, a atividade da fosfatase alcalina, as proteínas da matriz não-colágena e as formações nodulares de matriz mineralizada no estudo de células da linhagem osteoblástica,
- Em culturas de macrófagos RAW 264.7, não promoveu alteração da viabilidade celular e das propriedades imunestimuladores e antiinflamatórias;
- No teste de difusão em ágar, não alterou a atividade antimicrobiana; e
- Em tecido subcutâneo de camundongos Balb/c isogênicos, permitiu a ocorrência de resposta tecidual adequada.

De maneira geral, a adição da clorexidina não apresentou benefícios adicionais à pasta à base de hidróxido de cálcio.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abbott PV, Heithersay GS, Hume WR. Release and diffusion through human tooth roots *in vitro* of corticosteroid and tetracycline trace molecules from Ledermix paste. *Endod Dent Traumatol* 1988;4:55-62.
- Abbott PV, Hume WR, Heithersay GS. Effects of combining Ledermix and calcium hydroxide pastes on the diffusion of corticosteroid and tetracycline through human tooth roots *in vitro*. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:188-92.
- Abu-Soud HM, Presta A, Mayer B, Stuehr DJ. Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: conversion of Nomega-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry* 1997;36:10811-6.
- Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod* 1999;25:282.
- Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:240-4.
- Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther* 2006;13:611-20.
- Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. *J Endod* 2002;28:163-7.
- Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006;17:317-22.
- Assed S. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura. Tese. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1994.
- Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76:899-910.
- Aubin JE. Osteogenic Cell Differentiation. In: Davies JE, editor. Bone engineering. Toronto, Canada, 2000.
- Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol* 1995;11:79-88.
- Barbosa CA, Gonçalves RB, Siqueira JF Jr, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod* 1997;23:297-300.

- Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:26-7.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J* 1997;30:155-9.
- Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod* 2004;30:413-7.
- Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:240-5.
- Basrani B, Tjaderhane L, Santos M, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis* *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:618-24.
- Bellows CF, Alder A, Wludyka P, Jaffe BM. Modulation of macrophage nitric oxide production by prostaglandin D2. *J Surg Res* 2006;132:92-7.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986;38:143-54.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14:27-40.
- Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol* 1989;133:8-13.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986;319:516-8.
- Bhambhani SM, Bolanos OR. Tissue reactions to endodontic materials implanted in the mandibles of guinea pigs. *Oral Surg Med Oral Pathol* 1993;76:493-501.
- Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res* 1973; 52:1087-91.
- Birman EG, Sampaio JMP, Magalhães J, Sato E. Estudo de propriedades físicas e biológicas de um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1990;4:25-30.
- Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci* 1998;106:576-81.
- Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 1994;13:301-13.
- Brennan SS, Foster ME, Leaper DJ. Antiseptic toxicity in wounds healing by secondary intention. *J Hosp Infect* 1986;8:263-7.

- Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod* 2001;27:325-7.
- Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:170-5.
- Cabral CT, Fernandes MH. *In vitro* comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig* 2007;11:155-64.
- Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod* 2003;29:583-6.
- Cannell JS. The use of antimicrobials in the mouth. *J Int Med Res* 1981;9:277-82.
- Catanzaro-Guimarães SA, Alle N. Estudo histoquímico da reação tecidual ao hidróxido de cálcio. *Estomatol Cult* 1974;8:79-82.
- Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod* 2006;32:17-23.
- Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod* 2006;32:556-9.
- Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da polpa*. 9 ed. Editora Elsevier, 2007.
- Costa MT, Lenza MA, Gosch CS, Costa I, Ribeiro-Dias F. *In vitro* evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J Dent Res* 2007;86:441-5.
- Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo JM, Schäfer E. Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand* 2005;63:143-52.
- D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25:351-3.
- De Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:135-42.
- De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-13.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:554-64.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003;51:633-41.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:628-36.

Delgado EMS. Estudo da biocompatibilidade de uma pasta à base de hidróxido de cálcio associada à clorexidina a 1,0%, no tecido conjuntivo subcutâneo da pata de ratos [Dissertação]. Araraquara: UNESP; 2002.

Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol* 1985;135:2562-8.

Do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004;18:242-6.

Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod* 1995; 21:122-7.

Ercan E, Dalli M, Duulgergil CT, Yaman F. Effect of intracanal medication with calcium hydroxide and 1% chlorhexidine in endodontic retreatment cases with periapical lesions: an *in vivo* study. *J Formos Med Assoc* 2007;106:217-24.

Estrela C, Estrela CRA, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001;27:720-3.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemalelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003;29:338-9.

Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod* 2007;33:715-22.

Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999;32:257-82.

Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J* 2002;13:118-22.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79-98.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:437-9.

Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. *In vitro* evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol* 1993;9:249-53.

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

Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 1977;48:212-5.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J* 2002;13:155-61.

Gomes BPFA, Vianna ME, NT Sena, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:544-50.

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 1986;57:370-7.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007;33:917-25.

Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Top* 2003;6:29-56.

Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J* 2003;36:100-5.

Hama S, Takeichi O, Hayashi M, Komiyama K, Ito K. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J* 2006;39:179-84.

Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988;14:125-7.

Heithersay GS. Periapical repair following conservative endodontic therapy. *Aust Dent J* 1970;15:511-8.

Heitz F, Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Effects of post-surgical cleansing protocols on early plaque control in periodontal and/or periimplant wound healing. *J Clin Periodontol* 2004;31:1012-8.

Helgeland K, Heyden G, Rølla G. Effect of chlorhexidine on animals cells *in vitro*. *Scand J Dent Res* 1971;79:209-15.

Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 1992;25:20-4.

- Hermann BW. Calcium as mitted zin behandeen und fullen von wurzel. Diss Wurzburg 1920.
- Hirst RC, Egelberg J, Hornbuckle GC, Oliver RC, Rathbun WE. Microscopic evaluation of topically applied chlorhexidine gluconate on gingival wound healing in dogs. J South Calif Dent Assoc 1973;41:311-7.
- Holland R, Souza, V, Holland Jr C, Nery MJ. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular. Influência da proporção pó-líquido. Rev Assoc Paul. Cir Dent 1971; 25:101-10.
- Holland R, Souza V, Holland-Jr C, Nery MJ. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular. Influência da proporção pó-líquido. Rev Assoc Paul Cir Dent 1971;25:101-10.
- Huang J, Wong HL, Zhou Y, Wu XY, Grad H, Komorowski R, Friedman S. *In vitro* studies and modeling of a controlled-release device for root canal therapy. J Control Release 2000;67:293-307.
- Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. J Mater Sci Mater Med 2004;15:767-71.
- Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007;80:486-90.
- Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. Anat Rec 1998;252:554-67.
- Jaunberzins A, Gutmann JL, Witherspoon DE, Harper RP. Effects of calcium hydroxide and tumor growth factor- β on collagen synthesis in subcultures I and V of osteoblasts. J Endod 2000;26:494-9.
- Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 1994;20:276-8.
- Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts *in vivo*. J Clin Periodontol 1988;15:415-24.
- Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;95:348-54.
- Jones DS, Brown AF, Woolfson AD, Dennis AC, Matchett LJ, Bell SE. Examination of the physical state of chlorhexidine within viscoelastic, bioadhesive semisolids using raman spectroscopy. J Pharm Sci 2000;89:563-71.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20:340-9.
- Kawakami T, Nakamura C, Hasegawa H, Eda S. Fate of Ca-labeled calcium hydroxide in a root canal filling paste embedded in rat subcutaneous tissues. J Endod 1987;13:220-3.

Kim DS, Han JH, Kwon HJ. NF-kappaB and c-Jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *Mol Immunol*. 2003;40:633-43.

Knuuttila M, Söderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol Scand* 1981;39:285-289.

Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004;30:572-6.

Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod* 2000;26:652-5.

Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, da Silva LA. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:232-8.

Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993;19:348-52.

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

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:680-5.

Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:69-74.

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;23:428-32.

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

Leonardo MR. Endodontia. Tratamento de canais radiculares. 1 ed. Artes Médicas: São Paulo, 2005.

Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29:565-6.

Löe H. Discussion of: methods and criteria in evaluation of gingival and periodontal response. *Int Dent J* 197;20:502-4.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

Lu Y, Liu T, Li X, Li H, Pi G. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:e78-84.

Lucarotti ME, White H, Deas J, Silver IA, Leaper DJ. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to conservation therapy? *Ann R Coll Surg Engl* 1990;72:388-92.

Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007;33:114-8.

Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999;70:1443-8.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993;268:12231-4.

Maurício CV. Estudo histomorfológico do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana. [Dissertação]. Araraquara: UNESP; 1980.

Mitchell DF, Shankwalker GB. Osteogenic potencial of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *J Dent Res* 1958;37:1157-63.

Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 1995;27:359-67.

Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1990;23:113-8.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;89:475-84.

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

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Murakami T, Murakami H, Ramp WK, Hudson MC, Nousiainen MT. Calcium hydroxide ameliorates tobramycin toxicity in cultured chick tibiae. *Bone* 1997;21:411-8.

Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E258-66.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30:785-7.

- Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996;33:214-31.
- Nellakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV, Chennai TN. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an *in vitro* evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:e138-41.
- Nelson Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide based root canal medicaments. *Int Endod J* 1999; 32:303-11.
- Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694-6.
- Nelson-Filho P. Avaliação antiinflamatória, após a injeção de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio, no tecido conjuntivo subcutâneo e na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos. Dissertação. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, 1996.
- Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 1993;9:95-100.
- Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004;37:38-41.
- Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, Unterkircher CS. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent* 2005;33:107-14.
- Oncag O, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an *in vivo* study. *J Clin Pediatr Dent* 2006;30:233-7.
- Onçag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.
- Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-30.
- Özbas H, Dindar S. Histopathological evaluation of tissue reactions to titanium dioxide in comparison with calcium hydroxide. *Int Endod J* 1996; 29:195-210.

- Patel P, Ide M, Coward P, Di Silvio L. The effect of a commercially available chlorhexidine mouthwash product on human osteoblast cells. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2006;14:67-72.
- Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:367-71.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-5.
- Perrier S, Kherratia B, Deschaumes C, Ughetto S, Kemeny JL, Baudet-Pommel M, Sauvezie B. IL-1ra and IL-1 production in human oral mucosal epithelial cells in culture: differential modulation by TGF-beta1 and IL-4. *Clin Exp Immunol* 2002;127:53-9.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.
- Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endod* 2003;29:340-5.
- Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 1992;63:526-32.
- Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321.
- Rabêlo RTS. Penetrabilidade de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na dentina radicular de dentes decíduos e permanentes. Avaliação do pH e da liberação de íons cálcio. Dissertação. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.
- Rosa AL, Beloti MM. TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells. *J Cell Biochem* 2003;89:1148-53.
- Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:488-92.
- Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 1994;20:127-9.
- Schäfer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am J Dent* 2001;14:233-7.
- Schilder H, Amsterdam M. Inflammatory potencial of root canal medicaments. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1959;12:211-21.
- Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-8.

Seltzer S. Root canal filling materials. In: Endodontology biologic considerations in endodontic procedure. 2 ed., 1988.

Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod 2000;26:751-5.

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. J Endod 2002;28:94-8.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. Braz Dent J 2004;15:109-14.

Silva LAB. Rizogênese incompleta. Efeitos de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na complementação radicular e na reparação periapical em dentes de cães. Estudo histológico. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria). UNESP: Faculdade de Odontologia de Araraquara, 1988.

Silva LAB. Cimentos obturadores de canal radicular à base de hidróxido de cálcio. Avaliação histopatológica do reparo apical e periapical em dentes de cães, da resposta inflamatória em tecido subcutâneo e da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos. Análise do pH, concentração de cálcio total e condutividade. Ribeirão Preto, 1995. 191p. Tese (Livre-Docência)-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod 1998;24:414-6.

Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. J Endod 2007;33:800-5.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J 1997;30:91-5.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod 1990;16:498-504.

Soares JA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Ito IY. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. Braz Dent J 2007;18:8-15.

Sodek J, Cheifitz S. Molecular regulation of osteogenesis. In: Davies JE, editor. Bone engineering. Toronto: Canada, 2000.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med 2000;11:279-303.

Sodek J, Zhang Q, Goldberg HA, Domenicuccio C, Kasugai S, Wrana JL, Shapiro H, Chen J. Non-collagenous bone proteins and their role in substrate-induced bioactivity. In: Davies JE, editor. The bone-biomaterial interface. Toronto: University of Toronto, 1991.

Sodek KL, Tupy JH, Sodek J, Grynpas MD. Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone* 2000;26:189-98.

Southard SR, Drisko CL, Killoy WJ, Cobb CM, Tira DE. The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroides gingivalis* in periodontal pockets. *J Periodontol* 1989;60:302-9.

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

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993;14:424-442.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-8.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B, Saito T. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J* 1999;32:124-30.

Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J* 2002;35:735-9.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733-9.

Teixeira M, Cerqueira F, Barbosa CM, Nascimento MS, Pinto M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *J Drug Target* 2005;13:129-35.

Teixeira HM, Do Nascimento AB, Hebling J, De Souza Costa CA. *In vivo* evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents. *J Oral Rehabil* 2006;33:542-50.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:86-90.

Trope M, Delano EO, Orstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod* 1999;25:345-50.

Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem* 2005;280:13487-92.

Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 2003;278:7949-55.

- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. Endod Dent Traumatol 1993;9:243-8.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:79-84.
- Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:128-37.
- Waltimo TM, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide *in vitro*. Int Endod J 1999;32:94-8.
- Wennberg A. Biological evaluation of root canal antiseptics using *in vitro* and *in vivo* methods. Scand J Dent Res 1980;88:46-52.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997;23:229-31.
- Wilken R, Botha SJ, Grobler A, Germishuys PJ. *In vitro* cytotoxicity of chlorhexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidine iodine mouthrinses on human gingival fibroblasts. SADJ 2001;56:455-60.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod 1995;21:513-5.
- Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lin HN, Lee PH, Jia HW, Huang SK, Jeng JH, Chang MC. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. Int Endod J. 2007 Sep 18; [Epub ahead of print]
- Yucel AC, Aksoy A, Ertas E, Guvenc D. The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:712-7.
- Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;96:608-13.
- Zerella JA, Fouad AF, Spångberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;100:756-61.
- Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. J Endod 2003;29:654-7.
- Zuccolotto CEBG. Detecção de NO, TNF- α e IL-1 produzidos em cultura de monócitos expostos à endotoxina (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio. Dissertação. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.