

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
“Prof. JOSÉ DE SOUZA HERDY”**

ROSANA BELCHIOR MIRANDA

**CITOTOXICIDADE DE ALGUNS CIMENTOS REPARADORES DE PERFURAÇÃO
RADICULAR SOBRE CÉLULAS L929**

Duque de Caxias

2007

ROSANA BELCHIOR MIRANDA

**CITOTOXICIDADE DE ALGUNS CIMENTOS REPARADORES DE PERFURAÇÃO
RADICULAR SOBRE CÉLULAS L929**

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Rivera Fidel

Duque de Caxias

2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE/ BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

M672c Miranda, Rosana Belchior.

Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfuração radicular sobre células L929 / Rosana Belchior Miranda; orientadora: Sandra Rivera Fidel. - Duque de Caxias, RJ, 2007.

104f. : il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Odontologia, 2007.

Bibliografia: f.95-99

1.Odontologia 2. Tratamento de canal radicular – Métodos 3. Cimentos dentários - Toxicidade. I. Fidel, Sandra Rivera. II. Título.

CDD - 617.6

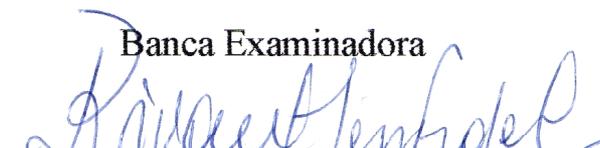
ROSANA BELCHIOR MIRANDA

**CITOTOXICIDADE DE ALGUNS CIMENTOS REPARADORES DE PERFURAÇÃO
RADICULAR SOBRE CÉLULAS L929**

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2007.


Prof.^a Dr.^a Sandra Rivera Fidel
Orientadora

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rivail Antonio Sérgio Fidel
Universidade do Grande Rio


Prof. Dr. Amauri Favieri
Universidade do Grande Rio


Prof.^a Dr.^a Teresa Cristina Ávila Berlinck
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho

Ao meu querido *Marcello*, maior incentivador de minhas escolhas, por estar sempre ao meu lado, torcendo pela minha vitória.

Às minhas amadas filhas, *Lívia e Thaís*, que vibram com nossas conquistas e são motivo de imenso orgulho.

Aos meus pais, *Zeca (in memorian) e Isaura*, por seus ensinamentos e, mais do que isso, pelo exemplo de vida, onde estudo e esforço alcançam objetivos.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, a quem confio plenamente a minha vida, por me guiar por caminhos de luz.

À Professora Doutora *Sandra Rivera Fidel*, Coordenadora do Curso de Mestrado da UNIGRANRIO e minha orientadora, pelo carinho e atenção durante todo este percurso, e pela simplicidade com que nos transmite suas experiências.

Ao Professor Doutor *Rivail Antonio Sérgio Fidel* pelo incentivo constante e por nos oferecer, integralmente, o laboratório da pós-graduação de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), onde pudemos desenvolver trabalhos de pesquisa.

Ao Professor Doutor *Amauri Favieri* por sua contribuição na produção científica durante o curso.

Ao Professor Doutor *Ivaldo Gomes de Moraes* por me ceder tão prontamente o cimento experimental MBPc, produto de sua linha de pesquisa.

À Professora *Maria Aparecida Affonso Boller*, do Laboratório de Vacinas Bacterianas do Departamento de Imunologia do INCQS/ FIOCRUZ, por nos receber nesta instituição com total disponibilidade e pela execução da fase experimental desta pesquisa.

À Professora Doutora *Leila Maria Lopes Bezerra*, do Departamento de Biologia Celular da UERJ, pelo inestimável auxílio na interpretação destes resultados.

Ao Professor Doutor *Marcos da Veiga Kalil* por viabilizar a execução deste projeto.

Ao Professor Doutor *Marco Antônio Alencar de Carvalho* pela orientação na confecção das amostras deste experimento.

À Professora Doutora *Luciana Sassone* por ter orientado o tratamento estatístico deste estudo.

Ao Ten.-Cel.-Dent. Aer *Elcymar Monteiro Teixeira*, Diretor da Odontoclínica de Aeronáutica Santos Dumont (OASD), que acredita na necessidade do aperfeiçoamento constante dos profissionais da Força Aérea Brasileira.

Ao Ten.-Cel.-Dent. Aer *Luiz Eduardo Monteiro Dias da Rocha*, Coordenador dos Cursos de Especialização da OASD, pelo apoio e confiança.

Ao Ten.-Cel.-Dent. Aer *Roberto da Gama Silveira* pelo incentivo.

À Maj.-Dent. Aer *Beatriz Coutinho da Silveira*, Coordenadora do Curso de Especialização em Endodontia da OASD, por sua amizade, compreensão em minhas ausências e por todos os ensinamentos, desde que fora minha professora no Curso de Especialização em Endodontia, e até hoje.

Ao Ten.-Dent. Aer *Marcelo Rolla de Souza* pelo companheirismo e amizade, tanto na OASD quanto no aprendizado compartilhado.

Aos colegas de turma *Rosangela Acris Pinheiro, Katiana Vidal, Leandro Lofgren, Alexandre Villela, Jaqueline Lugraf e Ricardo Carvalho* pela boa convivência durante o curso.

Aos funcionários do mestrado da UNIGRANRIO e da UERJ, em especial a *Monica Cristina de Souza*, pela elaboração da estatística deste estudo e a *José Angelus Furtado de Mendonça*, pela atenção valiosa no laboratório da UERJ.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O agregado trióxido mineral (MTA) é, atualmente, o material de eleição para o selamento de perfurações radiculares devido às excelentes propriedades físico-químicas e biológicas que tem revelado nas pesquisas e na clínica. O MTA branco surgiu para melhorar a estética. O cimento experimental MBPc, à base de resina epóxica e hidróxido de cálcio, vem sendo estudado para o mesmo fim. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do cimento experimental MBPc e do MTA Branco Angelus®, comparando-os com o ProRoot™ MTA cinza, que já está mundialmente estabelecido como material biocompatível. Para isto, foi realizado o ensaio de difusão em agar com o corante vermelho neutro, sobre células L929. Em placas de 6 poços, as células foram semeadas na concentração de 2×10^5 células/ml, em meio Dulbecco's com 5% de soro fetal bovino. O ensaio foi realizado em triplicata com as amostras endurecidas por 48 h, teflon como controle negativo e látex como controle positivo, colocados sobre a camada de agar. Após 24 h em estufa umidificada a 37° C com 5% CO₂, um halo claro se formou ao redor das amostras e dos controles positivos, relativo à citotoxicidade dos espécimes. As medidas foram tomadas por quadrante e a média foi qualificada, de acordo com a tabela de grau de citotoxicidade do POP/ FIOCRUZ. As zonas de inibição e a morfologia celular foram avaliadas sob microscópio invertido. Os resultados revelaram grau 1 (leve) para os dois tipos de MTA ($p > 0,05$) e grau 2 (branda) para o MBPc ($p < 0,001$). Todas as amostras foram consideradas satisfatórias, pois nenhuma cultura exposta aos cimentos revelou toxicidade superior ao grau 2.

Palavras-chave: perfuração radicular; cimentos endodônticos; citotoxicidade.

ABSTRACT

Mineral trioxide aggregate has been widely used to repair root perforations because of its excellent physical, chemical and biological properties, showed through research and clinical results. The white MTA has become available for the aesthetic needs. A new experimental epoxy resin and calcium hydroxide based cement (MBPc) is being developed to the same purpose of MTA. The aim of the present study was to compare the cytotoxicity of the experimental MBPc and the MTA Branco Angelus® with gray ProRoot™ MTA, that is worldwide known as biocompatible. The agar overlay method with neutral red dye was used onto L929 cells. Cells were seeded into 6-well culture plates at an initial density of 2×10^5 cells/ml in Dulbecco's MEM with 5% bovine fetal serum. Three samples of each 48-h set test materials, teflon as negative control and latex as positive control were placed on the agar overlay. After an incubation period of 24 h at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, the nonviable cells area was measured. The average values were turned into grades in accord to POP/FIOCRUZ table. The zones of lysis and the cell morphology were examined in an inverted microscope. The results showed grade 1 (slight) for the two types of MTA ($p > 0,05$) and grade 2 (mild) for the MBPc ($p < 0,001$). All the samples met the requirements of the test because none of the cultures exposed to the test cements showed reactivity higher than grade 2.

Key-words: root perforation; endodontic sealers; cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

Ca - íon cálcio

Ca (OH)₂ - hidróxido de cálcio

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HI - hidroxiapatita

h- horas

IL - Interleucina

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRM - Intermediate Restorative Material (Dentsply)

LPD - ligamento periodontal

min - minutos

ml - mililitro

mm – milímetro

MBPc - Moraes/ Berbert pasta cirurgia

MEM –Minimal Essencial Medium

MET - microscópio eletrônico de transmissão

MEV - microscópio eletrônico de varredura

MTA - agregado trióxido mineral

P - íon fósforo

PCR - polymerase chain reaction

pH - potencial de hidrogênios iônicos

X - vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cimentos selecionados para o experimento	52
Figura 2. Monocamada de células L929, em aumento 100X, antes da aplicação do corante	52
Figura 3. Microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100, com máquina Nikon FDX 35 acoplada	55
Figura 4. a) molde de gesso; b) placa de silicone para a confecção das amostras com 6 mm de diâmetro x 1 mm de espessura	55
Figura 5. Placa com o cimento aplicado	55
Figura 6. a) remoção do meio de cultura dos poços; b) lavagem com PBS; c) aspiração do agar; d) colocação de 1ml deste sobre as monocamadas celulares	57
Figura 7. As placas na capela de fluxo laminar vertical, aguardando a solidificação do agar	58
Figura 8. Colocação do controle positivo sobre o agar.....	58
Figura 9. Placas de 6 poços com os controles celular, negativo e positivo e as amostras testadas	59
Figura 10. Esquema das placas de 6 poços	60
Figura 11. Placas embrulhadas em alumínio e levadas à estufa a 37°C com 5% de CO ₂ no ar	60
Figura 12. Representação gráfica das médias de extensão dos halos dos cimentos, comparando-os entre si e com os controles	69
Figura 13. Representação gráfica das médias de extensão dos halos dos cimentos, comparando os métodos visual e digital	70
Figura 14. a, c, e) visão macroscópica do poço; b, d, f) poço sem amostra e sem agar.....	72
Figura 15. a, c) área do halo de inibição em aumento 40X; b,d) a mesma área em 100X	73
Figura 16. a) controle (-) teflon; b) controle (+) látex; c) controle (-) 100X; d) controle (+) 100X; e) controle celular 100X	74

Figura 17. Controle celular para a observação da morfologia: a) 200X; b) 400X	76
Figura 18. Poço 3 do ProRoot™, destacando a área com células viáveis junto ao cimento e lise sob ele, após a sua remoção(100x)	76
Figura 19. Poço 2 do MTA Branco Angelus® em 100X: a) lise celular; b) arredondamento das células com desprendimento do substrato; c) alteração de forma; d) células viáveis, em monocamada	77
Figura 20. Poço 3 do MBPc: a) menor extensão do halo (40X); b) destaque em 100X; c) destaque em 200X; d) destaque em 400X	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula dos cimentos, segundo informações dos fabricantes	51
Tabela 2. Interpretação dos resultados do ensaio de difusão em agar, de acordo com o POP/ FIOCRUZ.	63
Tabela 3. Extensão das áreas descoradas nos poços das amostras, em mm, medida visualmente	66
Tabela 4. Extensão das áreas descoradas nos poços das amostras, em mm, medida através do software Image Tool®	67
Tabela 5. Extensão das áreas descoradas nos poços dos controles positivos (+) e negativos (-), em mm, obtidas visualmente	68
Tabela 6. Extensão das áreas descoradas nos poços dos controles positivos (+) e negativos (-), em mm, medidas através do software Image Tool®	68
Tabela 7. Médias obtidas pelos métodos de medição visual e digital	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Da metodologia em cultura de células	19
2.2 Dos cimentos testados	
2.2.1 MTA	25
2.2.2 MBPc	40
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Material	
4.1.1 Cimentos	50
4.1.2 Linhagem celular	51
4.2 Métodos	
4.2.1 Preparo da cultura celular	53
4.2.2 Preparo das amostras	54
4.2.3 Método de difusão em agar	56
4.2.4 Coleta de dados	61
4.2.5 Avaliação da citotoxicidade	62
4.2.6 Interpretação dos resultados	62
4.2.7 Determinação da validade do ensaio	63
4.2.8 Análise estatística	63
4.2.9 Análise da morfologia celular	64
4.2.10 Limitações dos métodos	64

5 RESULTADOS	65
5.1 Interpretação dos resultados	71
5.2 Análise da morfologia celular	75
6 DISCUSSÃO	79
6.1 Da linhagem celular	80
6.2 Da metodologia	81
6.3 Dos cimentos testados	82
6.3.1 MTA	83
6.3.2 MBPc	86
6.4 Dos resultados	87
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	100
ANEXO A - Procedimentos com células L929	101
ANEXO B - Meios utilizados nas culturas celulares	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O restabelecimento da saúde e função do elemento dentário que necessita de intervenção pulpar é o objetivo da endodontia. Apesar do aperfeiçoamento constante de técnicas, instrumentos e materiais que permitam um tratamento adequado do sistema de canais radiculares, complicações podem acontecer, como uma perfuração radicular.

As perfurações radiculares resultam na comunicação do canal radicular com os tecidos periodontais. Ocorrem devido a processos de reabsorção, cáries, acidentes indesejáveis durante o tratamento endodôntico ou, ainda, na preparação de espaço protético para pinos intrarradiculares. Em um estudo analítico das causas de fracassos endodônticos, Ingle (1979) registrou as perfurações radiculares iatrogênicas em segundo lugar de ocorrência. As perfurações causam envolvimento periodontal secundário e eventual perda do dente (ALHADAINY, 1994).

A busca incessante por materiais com propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos pulpar e periapical demonstra que o respeito aos princípios biológicos norteiam as pesquisas nesta especialidade. Os materiais reparadores de perfuração radicular, assim como os retrobturadores, têm grande influência no metabolismo dos tecidos perirradiculares, já que ficam em contato direto com estes.

Em 1993, Lee, Monsef e Torabinejad publicaram o primeiro trabalho com o agregado trióxido mineral (MTA), desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia - EUA) pelo Dr. Mahmoud Torabinejad, no reparo de perfurações radiculares. Desde então, este material vem sendo amplamente estudado, para esta e outras aplicações clínicas. Inicialmente, era comercializado sob a marca ProRoot™

MTA. Em 2001, foi introduzido no mercado brasileiro o MTA Angelus®, que é produto nacional. Recentemente, o MTA branco surgiu para melhorar a estética, propriedade importante quando se trata de perfuração em face vestibular da raiz.

Apesar das excelentes propriedades do MTA, as pesquisas continuam no sentido de melhorar algumas delas, como facilidade de manipulação e de inserção e diminuição do tempo de endurecimento.

O cimento endodôntico cirúrgico experimental MBPc está sendo desenvolvido na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo. Seu uso é indicado em obturações retrógradas e perfurações radiculares. A partir dos bons resultados experimentais quanto à sua capacidade seladora e histocompatibilidade, é interessante testar sua citotoxicidade.

Citotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, histocompatibilidade e efeitos bacterianos são parâmetros para o estudo da biocompatibilidade, que pode ser definida como a capacidade de um material funcionar em uma aplicação específica, provocando uma resposta apropriada do hospedeiro (WILLIAMS, 1987 apud HAUMAN; LOVE, 2003a). De acordo com a International Organization for Standardization (ISO 10993), diferentes testes, *in vivo* e *in vitro*, podem ser aplicados para este fim.

Normalmente, um grande número de animais de laboratório é necessário para os testes *in vivo*. Por pressão ética e econômica, experimentos *in vitro* com linhagens celulares estabelecidas foram introduzidos, permitindo determinar a citotoxicidade por eventos quantificáveis e facilmente reproduzíveis, diminuindo o sacrifício de animais. Os testes com culturas celulares vêm sendo realizados há mais de 40 anos. Rappaport, Lilly e Kapsimalis, já em 1964, afirmavam que estes seriam rápidos, sensíveis e definitivos como métodos de avaliação dos materiais

endodônticos. A parte 5 da ISO 10993 trata dos testes de citotoxicidade - métodos *in vitro* para materiais médicos e dentários.

Destarte, a citotoxicidade se coloca como o primeiro teste de biocompatibilidade para a avaliação de um material. Diante do crescente interesse das pesquisas nesta área, este estudo visou elucidar esta propriedade do cimento experimental MBPc e do MTA Branco Angelus®, comparando-os com ProRoot™ MTA cinza, que já está mundialmente estabelecido como material biocompatível.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura transcorreu em ordem cronológica e, além de pesquisas relevantes quanto à biocompatibilidade dos cimentos testados, também buscou apresentar as propriedades físico-químicas que os caracterizam. Para melhor compreensão da metodologia empregada, abordaram-se, inicialmente, estudos da toxicidade em cultura de células.

2.1 Da metodologia em cultura de células

Rappaport, Lilly e Kapsimalis (1964) realizaram um estudo com 10 cimentos endodônticos, testando sua biocompatibilidade e capacidade bactericida. No teste em cultura celular, os materiais foram colocados em suspensão sobre cultura de células HeLa, já que um estudo preliminar havia revelado que cilindros de 4 a 6 mm preparados com os cimentos foram extremamente tóxicos, quando colocados diretamente sobre elas. Através de observação microscópica, em intervalos de 1 h a 96 h, evidenciaram a citotoxicidade promovida pelos materiais, em diluições seriadas.

Em 1989, Safavi et al. desenvolveram um método para a avaliação dos efeitos tóxicos de cimentos endodônticos. Eles introduziram um dispositivo de base porosa, que levava o material para os orifícios das placas de cultura, sem tocar o fundo, onde estava a camada celular. Isto permitiu a observação de seus efeitos sobre as células, durante o endurecimento. Assim, pôde-se avaliar a mesma amostra em vários tempos, e uma alta toxicidade inicial pôde ser notada.

Babich e Borenfreund (1990) relataram que um esforço concentrado estava sendo feito para o desenvolvimento de alternativas para o uso de animais vivos em

testes de toxicidade. Para este fim, o método *in vitro* de citotoxicidade com o corante vermelho neutro vinha se estabelecendo na testagem de agentes químicos.

Roberfroid e Goethals (1990) registraram o crescente questionamento da validade do uso de animais como modelos em pesquisa biomédica, devido ao sofrimento destes nos experimentos. Russel e Burch (1954 apud Roberfroid e Goethals, 1990) já defendiam a substituição ou diminuição do número e do sofrimento dos animais com a teoria *The 3 R's (replacement, reduce and refinement)*.

Wendt, Ziemiecki e Spängberg (1993) avaliaram o novo método de testagem de citotoxicidade de biomateriais sólidos descrito por Safavi et al. (1989). Neste estudo, a mesma amostra foi trocada de meio, com preparado fresco de células L929, para novas observações dos efeitos sobre estas, a cada intervalo de tempo. Afirmaram que este teste de difusão, ao contrário dos testes de contato direto, mimetiza bem a ação dos componentes solúveis dos cimentos.

Torabinejad et al. (1995b) testaram a citotoxicidade de quatro materiais retroobturadores em cultura de células L929, a mais comumente usada em testes de biocompatibilidade, através de duas metodologias: difusão em agar com corante vermelho neutro e liberação de radiocromo. Os autores afirmaram que os resultados advindos da metodologia que utiliza o agar dependem da taxa de difusão das substâncias presentes nos materiais, de seus pesos moleculares e de sua solubilidade. Ressaltaram que as variáveis nos testes *in vitro* são mais fáceis de controlar do que nas técnicas *in vivo*, embora não traduzam as interações entre o material e o tecido vivo.

De acordo com a International Organization for Standardization (ISO) 10993-5, revisão de 1996, há 3 categorias para determinar a resposta biológica, *in vitro*, das células de mamíferos: testes de extração, de contato direto e indireto. A escolha será

feita segundo a natureza da amostra e do tipo de avaliação de citotoxicidade desejada, ou seja, alterações morfológicas, medida do dano celular, do crescimento celular ou aspectos do metabolismo. Afirma que as linhagens estabelecidas de células são preferíveis às primárias, mas que estas podem ser utilizadas para respostas mais específicas. A linhagem L929 é uma das estabelecidas recomendadas.

Busato, Costa e Estrela (1997) enfatizaram que a indicação de qualquer material odontológico deve ser baseada em suas propriedades físicas e biológicas, reveladas pela seqüência de testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, os autores afirmaram que os resultados destas metodologias podem não ser conclusivos, mas devem servir de base para a recomendação do uso clínico dos materiais.

Cruz et al. (1998), do Instituto Adolfo Lutz, compararam a sensibilidade do método de difusão em agar e do método de extração. Utilizaram as linhagens celulares RC-IAL (células fibroblásticas de rim de coelho) e HeLa (células epiteliais de carcinoma do útero humano) na avaliação da citotoxicidade *in vitro* de materiais de uso médico-hospitalar. O método de difusão em agar detectou citotoxicidade nas menores concentrações dos produtos avaliados. Isto permitiu concluir que este método foi mais sensível em relação ao método de extração, experimentalmente, isto é, em concentrações estritamente iguais sem qualquer variação eventual ocorrida pelo tamanho das amostras testadas, nos dois tipos celulares.

Makkawy et al. (1998) utilizaram células do LPD, provenientes dos terceiros molares extraídos de um paciente, para testarem a citotoxicidade de 3 materiais reparadores de perfuração radicular. A citotoxicidade foi representada pelo número de células viáveis após exposição aos extratos por 24 h e comparadas ao controle

(culturas somente expostas ao meio). Ressaltaram que a análise *in vitro* investiga com métodos simplificados, minimizando as variáveis, mas que os resultados obtidos podem não ser exatamente os mesmos da clínica.

Azar et al. (2000) enfatizaram que os métodos *in vitro* são simples, de baixo custo, relevantes e adequados para a avaliação das propriedades biológicas básicas dos materiais dentários. Utilizaram cultura celular de fibroblastos gengivais humanos e, sobre estas células, colocaram o meio com os extratos dos cimentos em teste. Após diferentes intervalos de tempo, os extratos eram removidos para a aplicação do corante vermelho neutro. Este, então, corava as células viáveis que foram medidas pela densidade ótica, através de espectrofotômetro. Os autores consideraram que os cimentos não devem ter contato direto com as células, pois promove dúvida se a citotoxicidade seria devida ao contato ou, realmente, ao efeito químico tóxico das substâncias testadas.

Cohen et al. (2000) utilizaram o método de difusão em agar com corante vermelho neutro para determinar a reatividade biológica da monocamada de células L929. Consideraram que a camada de agar protege a camada celular de dano físico, enquanto permite a difusão dos componentes solúveis dos cimentos.

A célula é a unidade fisiológica dos seres vivos. As propriedades vitais de um organismo dependem das reações do metabolismo celular. Para o estudo ao microscópio óptico, é necessário o tratamento prévio com corantes. Para observar uma célula viva, usamos corantes denominados vitais, pois não destroem sua estrutura. Para observações demoradas e repetidas, usam-se fixadores (álcool ou formol, por exemplo) para sua conservação, com o mínimo possível de alteração (LINHARES; GEWANDSZNAJDER, 2003).

Rogero et al. (2003) avaliaram *in vitro* a biocompatibilidade de diferentes tipos de biomateriais em cultivo de células da linhagem clone 929, através de duas metodologias: 1) ensaio de difusão em agar; 2) ensaio de incorporação do vermelho neutro. Concluíram que ambas podem ser usadas, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada. O corante vermelho neutro é solúvel em água e passa através das membranas, concentrando-se nos lisossomos. A característica de citotoxicidade no ensaio de difusão em agar foi constatada pela presença de um halo claro ao redor da amostra, que é visto quando há lise e conseqüente liberação do corante. Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade dos biomateriais para uso em seres humanos. Algumas das vantagens dos métodos *in vitro* sobre os métodos *in vivo* estão na utilização de curto período experimental e custos baixos, sendo possível obtermos dados significativos, com variáveis limitadas.

Hauman e Love (2003a), revisando os testes de biocompatibilidade de materiais de uso endodôntico, afirmaram que é impossível caracterizá-los biologicamente através de um único método. Suas propriedades devem ser investigadas por uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo*. Seqüencialmente, dos testes mais simples para os mais complexos: toxicidade não-específica (cultura de células ou pequenos animais de laboratório); toxicidade específica (*usage* testes - em cachorros e macacos, geralmente) e testes clínicos em humanos. Estudos com culturas celulares podem utilizar linhagens permanentes, como HeLa, 3T3 e L929, ou células humanas primárias, principalmente fibroblastos orais. Consideraram que células primárias são mais relevantes para estes estudos. Os mesmos autores

(2003b) concluíram que somente os materiais que comprovassem, *in vitro* e *in vivo*, biocompatibilidade aceitável deveriam ser considerados para uso clínico.

Presgrave e Presgrave (2004), cientistas do INCQS/ FIOCRUZ, pesquisaram uma técnica que limitasse o uso de animais de laboratório. Utilizaram as linhagens de células SIRC e a 3T3 com o método de captação do corante vermelho neutro, que cora as células vivas após o contato com os produtos. Dessa maneira, realizaram uma triagem, onde somente os produtos que mostrassem ser pouco ou nada irritantes em cultura celular seriam testados nos animais, limitando, assim, o sofrimento destes.

A cultura de células representa o estágio inicial de investigação de um material dentário, sendo de grande valor para o entendimento da resposta tecidual. Ainda assim, há que se considerar sua limitação, interpretando-se os resultados com a devida relatividade, pois nem sempre a toxicidade laboratorial corresponde à compatibilidade tecidual, já que não há reprodução da dinâmica dos tecidos periapicais (QUEIROZ et al., 2005).

Carvalho (2005) testou a citotoxicidade de 3 cimentos endodônticos, através do método de difusão em agar com o corante vermelho neutro, em cultura de células L929. Utilizou uma placa de silicone para a padronização das amostras em discos de 5 mm de diâmetro X 1 mm de espessura. Obteve os resultados a partir da contagem das células sobreviventes na maior área do halo de inibição.

Em 2005, realizou-se um Encontro no INCQS/ RJ (EMALT), entre profissionais brasileiros e europeus, a respeito da validação de métodos alternativos para o uso de animais em pesquisa. Presgrave (INCQS) enfatizou que os custos dos métodos *in vitro* podem ser de 60 a 90% menores do que os métodos *in vivo*,

enquanto David Morton relatou que seria importante o uso de animais para a observação de sinais clínicos, peso e temperatura corporais, ao invés de letalidade.

Segundo o guia da ANVISA (2006) para a avaliação da segurança de produtos, é essencial o uso de metodologias alternativas que reduzam a pesquisa com animais. A utilização de culturas celulares com corante vermelho neutro tem excelente aplicabilidade para testar a citotoxicidade, de duas maneiras: a) difusão em gel, onde o material é aplicado à superfície de um gel de agarose em contato com células de tecido conjuntivo de camundongo, da linhagem NCTC – clone 929, e a citotoxicidade é avaliada através da observação do diâmetro médio do halo de lise celular revelado pela coloração; b) método de vermelho neutro, onde este corante vital é adicionado à cultura celular e a captação dele pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria, através de um leitor automático de microplacas.

2.2 Dos cimentos testados

2.2.1 MTA

Lee, Monsef e Torabinejad (1993) realizaram estudo *in vitro*, apresentando o novo cimento que a equipe desenvolveu na Universidade de Loma Linda, o agregado trióxido mineral (MTA). Descreveram o material como um pó de finas partículas hidrofílicas, composto, principalmente, por silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e óxido de silicato, além de outros óxidos. A hidratação do pó resulta em um gel coloidal que se solidifica em menos de 4 h. O estudo consistiu em criar perfurações laterais nas superfícies radiculares de 50 molares extraídos, que foram obturadas com amálgama, IRM e MTA. Os dentes foram colocados em

solução, simulando as condições clínicas. Após 4 semanas, mergulharam os espécimes em corante azul de metileno, por 48 h. Compararam a qualidade do selamento dos materiais pela infiltração do corante. O MTA apresentou os melhores resultados, sendo a diferença estatisticamente significativa.

Torabinejad et al. (1995a) determinaram a composição química, pH e radiopacidade do MTA, além de compararem seu tempo de endurecimento, resistência à compressão e solubilidade com o amálgama, o Super-EBA e o IRM. Óxido de bismuto foi adicionado ao MTA, para conferir radiopacidade. Seus resultados mostraram que as principais moléculas presentes neste material são os íons cálcio e fósforo. O pH foi 10,2 inicialmente, aumentando para 12,5 após 3 h da manipulação. O MTA se apresentou mais radiopaco que o IRM e o Super-EBA e menos que o amálgama. O MTA apresentou o maior tempo de endurecimento – 2h e 45 min. Embora se considere que quanto mais rapidamente um material endureça, maior será sua estabilidade dimensional, pode ocorrer que quanto mais rápido endurece, mais trincas ocorrem, explicando, assim, os menores graus de infiltração por corantes e bactérias demonstrados em outros estudos com o MTA. Quanto à resistência, o MTA apresentou a mais baixa e, exceto o IRM, nenhum deles mostrou solubilidade, sob as condições do estudo.

Torabinejad et al. (1995b) testaram a citotoxicidade de quatro materiais retroobturadores em cultura de células L929. Amálgama, Super-EBA, IRM e MTA foram avaliados através de duas metodologias: difusão em agar com corante vermelho neutro e liberação de radiocromo. O amálgama foi o menos citotóxico no método de difusão em agar, enquanto o MTA ficou em segundo lugar. Esta condição se inverteu no método de liberação de radiocromo. Nas duas metodologias, o Super-EBA ficou em terceiro lugar e o IRM foi o mais tóxico.

Ford et al. (1995) investigaram a resposta histológica à perfuração intencional de furca em 28 pré-molares de cães, divididos em dois grupos de 14 dentes: no grupo 1, as perfurações foram imediatamente reparadas, com amálgama ou MTA; no grupo 2, foram deixadas abertas para a contaminação salivar antes do reparo. Após 4 meses, as amostras foram removidas, preparadas em cortes verticais e examinadas, histologicamente. No grupo 1, todas as amostras com amálgama estavam associadas com inflamação, mas com MTA, isto ocorreu somente em 1 espécime - no restante, havia cimento sobre o material; no grupo 2, todas as amostras com amálgama estavam associadas com inflamação, o que ocorreu em apenas 4, com MTA. Assim, os autores concluíram que o MTA é mais adequado para o reparo de perfurações de furca que o amálgama, principalmente no reparo imediato.

Torabinejad et al. (1997) examinaram a resposta tecidual perirradicular ao MTA e ao amálgama, em obturações apicais, em macacos. Após 5 meses, os animais foram sacrificados para a avaliação histológica dos 2 grupos, com 6 dentes cada. O grau de inflamação dos tecidos em contato com o grupo do amálgama foi severo em 4 amostras e moderado em 2, enquanto no grupo do MTA, apenas 1 mostrou inflamação, que foi severa. Uma camada espessa de cimento foi observada sobre o MTA das 6 amostras, inclusive com algumas fibras do LPD inseridas nas linhas incrementais, mas em nenhuma das amostras no grupo do amálgama.

Osorio et al. (1998) mediram a citotoxicidade dos materiais retroobturadores amálgama, Ketac Silver, MTA e Super-EBA. Utilizaram culturas celulares da linhagem L929 e culturas de fibroblastos gengivais humanos, com duas metodologias: MTT (capacidade das enzimas mitocondriais converterem o sal

tetrazolium – avalia o metabolismo celular) e cristal violeta (união às proteínas nucleares – avalia a proliferação celular). Todos os materiais testados foram citotóxicos, com exceção do MTA que não foi citotóxico em nenhum dos testes.

Koh et al. (1998) testaram a resposta celular aos cimentos MTA e IRM em cultura de células MG-63, de osteossarcoma humano. Escolheram esta linhagem porque a resposta, no que diz respeito à produção de citocinas, é similar à dos osteoblastos humanos. Estas glicoproteínas estão envolvidas na coordenação do metabolismo ósseo e, como o objetivo do estudo foi descobrir porque a cementogênese parece ser induzida pelo MTA, esta metodologia foi a eleita. As amostras foram observadas sob MEV. A verificação foi feita em 1, 3 e 7 dias. Em contato com o MTA, os osteoblastos cresceram com morfologia normal e aderidos a este, em 1 e 3 dias, demonstrando a biocompatibilidade do material. Nas amostras com o IRM, as células apareceram arredondadas e houve um esgotamento do número em 3 dias, demonstrando a toxicidade deste cimento. Utilizaram um método específico para medir citocinas humanas (ELISA), investigando IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e fator de estimulação de macrófagos. Os níveis médios das citocinas testadas aumentaram quando as células cresceram na presença do MTA, em 72 h. Ao contrário, as que cresceram sozinhas ou com o IRM produziram imperceptíveis quantidades destas.

No estudo de Shabahang et al. (1999), comparando a formação de barreira calcificada no fechamento apical, em cães, com proteína osteogênica-1, hidróxido de cálcio e MTA, ficou evidente o significativo potencial de indução do MTA, de praticamente o dobro dos outros 2 materiais. Foi verificado infiltrado inflamatório em todos os grupos, porém ocorreu em somente metade das raízes tratadas com MTA.

A avaliação histológica mostrou que mesmo quando extruído, além do ápice, houve formação de uma banda de tecido duro em volta de todo o segmento do material.

Torabinejad e Chivian (1999) relacionaram as aplicações clínicas do MTA, descrevendo as técnicas de aplicação em polpa vital, plug apical em ápices abertos, reparo de perfurações radiculares, obturações de retropreparos apicais e outras. As indicações basearam-se em experimentos prévios, *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram sua capacidade de selamento e biocompatibilidade, com regeneração dos tecidos originais em contato com este material (pulpar ou periodontal).

Holland et al. (1999) observaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de tubos de dentina de raízes de dentes humanos, preenchidos com Ca(OH)_2 ou MTA. Os animais foram sacrificados e os tubos com os tecidos ao redor removidos e preparados por 3 técnicas: alguns cortes foram corados pela técnica Von Kossa para cálcio; outros, sem corante, foram examinados sob microscópio de luz polarizada para localizar material birrefringente; o restante foi descalcificado e corado por hematoxilina e eosina. Os 2 materiais apresentaram resultados similares: grânulos Von Kossa positivos, birrefringentes à luz polarizada e tecidos irregulares como pontes. Células gigantes, leve infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo fibroso também foram identificados. Concluíram que o MTA, assim como o Ca(OH)_2 , estimula a deposição de tecido duro.

Zhu et al. (2000) usaram MEV para avaliar a resposta celular de osteoblastos humanos aos MTA, IRM, resina composta e amálgama, *in vitro*. A adesão e a distribuição das células sobre a superfície de um material é a fase inicial para função celular. A persistência de forma arredondada, com nenhuma ou pouca distribuição, sugere que a superfície do material deva ser tóxica. Os resultados evidenciaram osteoblastos bem aderidos e espalhados somente sobre o MTA e a resina.

Keiser, Johnson e Tipton (2000) investigaram a citotoxicidade do MTA comparada a do Super-EBA e a do amálgama, em culturas celulares de fibroblastos do LPD humano de dentes extraídos, expostas aos extratos dos materiais, em 2 diluições. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com MTT. Com os materiais recém-manipulados, o MTA mostrou a menor toxicidade. Com as amostras endurecidas a 24 h, a toxicidade do amálgama foi menor, a do Super-EBA não se alterou e a do MTA caiu significativamente na alta concentração.

Por ser reconhecido como excelente escolha em vários procedimentos endodônticos, Herzog-Flores et al. (2000) analisaram física e quimicamente o MTA, para conhecerem sua composição e, assim, entender seu comportamento biológico. Para determinar a composição química, utilizaram 3 técnicas: ensaios analíticos químicos, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Estas concordaram que o cálcio é o elemento que existe em maior quantidade (90% de CaO), além de concentração importante de óxido de bismuto. O MTA, por difração de raios X, se mostrou cristalino com fundo amorfo, o que lhe confere maior estabilidade e adesividade. Após manipulação com solução salina, o tempo de endurecimento se iniciou em 30 min, diferentemente da literatura que define este tempo em 2 h e 45 min. Na leitura do pH, após 5 min de centrifugação, encontraram 11,54. Por calorimetria de varredura, determinaram o ponto de fusão do MTA em 100° C, o que limita a possibilidade de esterilização. Através de um espectrofotômetro de absorção atômica, observaram que a liberação de íons cálcio foi muito menor que o esperado, já que é o íon de maior concentração no material. Concluíram, então, que os mecanismos de reparação com o MTA se fundamentam mais em sua capacidade de manter um pH alcalino, do que na liberação de íons cálcio.

Holland et al. (2001) observaram a cura tecidual após o reparo de perfurações laterais em 48 raízes de dentes de cães, e imediatamente obturadas com MTA e um cimento à base de Ca(OH)_2 (Sealapex®). A análise histológica foi feita após 30 e 180 dias. Na maioria dos espécimes obturados com MTA não havia inflamação, e sim, cimento neoformado sobre o material. Já no grupo do Sealapex®, havia inflamação em todos os espécimes e deposição de cimento em apenas 3 casos, aos 180 dias.

Holland et al. (2002) pesquisaram a reação tecidual ao implante de MTA branco (Loma Linda University) em conjuntivo subcutâneo de rato, antes de seu lançamento no mercado. O mesmo experimento já havia sido realizado com o MTA cinza (HOLLAND et al., 1999). Os autores comprovaram os mesmos resultados, concluindo que o MTA branco tem o mesmo mecanismo de ação que o MTA cinza.

Pérez et al. (2003) investigaram a adesão de células osteoblásticas primárias e de células MG-63 de osteossarcoma na superfície do ProRoot™ MTA e do MTA branco. As amostras foram preparadas após 6, 9 e 13 dias de exposição, para serem vistas sob MEV. No início, as células cresceram na superfície dos materiais, porém sobre o MTA branco, as células primárias não sobreviveram até o 13º dia. Os autores afirmaram que a superfície deste material difere do cinza por ser mais áspera e que isto influencia não só a adesão celular, como a proliferação e a diferenciação. Somando a isso, a diminuição significativa do íon ferro pode contribuir na perda da adesão dos osteoblastos.

Thomson et al. (2003) estudaram os efeitos do MTA sobre o crescimento dos cementoblastos e a produção de osteocalcina (OCN), na cultura de células imortalizadas OCCM.30. Para que o cimento se forme sobre um substrato, é preciso que os cementoblastos se adiram e proliferem. Observaram, sobre o MTA,

numerosas células com morfologia normal. A forte expressão do gen OCN nas células OCCM.30, nos controles e no MTA, é sugestiva de que processos de mineralização podem ocorrer sob condições experimentais. Os resultados levaram os autores a afirmar que o MTA é cementocondutivo.

Como tem sido sugerido que, para estimular a mineralização, um material deve ter pH alcalino e liberar cálcio, Duarte et al. (2003) compararam o ProRoot™ MTA e o MTA Angelus® quanto ao pH e à liberação de íons cálcio. Estes cimentos são ricos em óxido de cálcio que, em contato com o fluido tissular, é convertido em hidróxido de cálcio, ocorrendo, então, a dissociação em íons cálcio e hidroxila, resultando em aumento de pH e liberação de cálcio. Tubos plásticos com os materiais foram imersos em água destilada, e esta medida em 3, 24, 72 e 168 horas. Os valores alcançados neste experimento, tanto para o pH (+/- 9,4) quanto para a liberação de cálcio, foram maiores durante as 3 primeiras horas, e levemente superiores para o MTA Angelus® em todos os períodos de tempo avaliados.

Economides et al. (2003) demonstraram a resposta tecidual ao MTA aplicado em retroobturações de dentes de cães, no período de 1 a 5 semanas. A reação mais característica ao MTA foi a presença de tecido conjuntivo depois da primeira semana de pós-operatório e, a partir daí, formação de tecido duro ativado progressivamente ao longo da interface MTA - tecido conjuntivo. Tecido duro não foi visto sobre o IRM, testado nas mesmas condições. Os autores concluíram que o MTA é biocompatível e estimula o reparo perirradicular.

Saidon et al. (2003) pesquisaram, em 2 tipos de experimento, a resposta biológica ao ProRoot™ MTA e ao cimento Portland. No método *in vitro*, as amostras dos cimentos frescos e endurecidos foram colocadas em dispositivo de base porosa, nos poços com cultura de células L929. As substâncias solúveis dos cimentos

alcançaram a cultura por difusão. Os autores examinaram a resposta celular com microscópio de fase e fotografaram para a análise. Observaram, então, área com células coaguladas abaixo das amostras, com lise celular ao redor e células normais à distância. No método *in vivo*, a reação tecidual foi avaliada com implantes de tubos de teflon com os cimentos em mandíbulas de porco-da-índia. Não houve diferença nas reações celulares entre os 2 cimentos, e a reação tecidual foi de cura, com mínima resposta inflamatória adjacente aos implantes. Os autores concluíram que os dois cimentos são biocompatíveis *in vitro* e *in vivo*.

Pistorius, Willershausen e Marroquin (2003) determinaram a reação celular de fibroblastos gengivais, obtidos da extração dentária de pacientes saudáveis, ao MTA, ao amálgama e a uma liga inerte de titânio. Avaliaram a liberação de prostaglandinas, a síntese de proteínas e lactato e a proliferação celular. Os fibroblastos sofreram diminuição altamente significativa em contato com o amálgama, ao contrário com MTA e titânio. Estes dois materiais provocaram alta taxa de síntese de prostaglandinas, cujo papel é de extrema importância durante o processo inflamatório, e é essencial nos processos de regeneração, proliferação e crescimento celular.

Haglung et al., em 2003, utilizando cultura de células L929 e macrófagos de rato, testaram o efeito de 4 materiais retrobturadores (MTA, IRM, amálgama e resina composta- Retroplast) sobre o crescimento e a morfologia celulares e, ainda, o estímulo na produção de citocinas. Aplicaram o método usado em estudo prévio de Safavi et al. (1989). Lembraram a importância destas substâncias na inflamação e na fase proliferativa da cura tecidual. Usaram os materiais logo após a manipulação (*fresh*) e depois de 2 semanas em meio de cultura celular (*set*). O período de incubação durou 3 dias e as amostras com IRM *fresh* ou *set* resultaram em um

número significativamente menor de células do que as culturas com os outros materiais. MTA *set* e amálgama *set* não produziram efeito sobre a morfologia celular, porém MTA e amálgama *fresh* determinaram proteínas desnaturadas e células mortas adjacentes ao material. Não houve produção de citocinas em nenhum grupo, avaliados através do método ELISA. Os autores ressaltaram que devido ao seu alto pH, o MTA *fresh* causa lise celular. Entretanto, após o endurecimento, mostrou-se altamente biocompatível sem efeito na morfologia e com limitado impacto no crescimento celular.

Balto (2004) avaliou a adesão e morfologia de fibroblastos do LPD humano sobre o MTA. O experimento consistiu em obturações retrógradas de 30 dentes unirradiculares extraídos, divididos em 2 grupos de 15 dentes. Um grupo foi exposto à cultura com MTA fresco e o outro, ao endurecido há 24 h. Foram observados sob MEV em 3 tempos: 4, 8 e 24 h. Os resultados mostraram que nas amostras com o MTA fresco, as células se apresentavam arredondadas e mal aderidas, inicialmente, mas com o aumento do tempo de incubação, aumentaram em número e se aderiram firmemente à superfície do material. O autor sugeriu que a qualidade e quantidade de adesão celular poderiam ser usadas como critério para a avaliação de toxicidade de um material.

Avaliando a biocompatibilidade dos MTA cinza e branco (ProRoot™) sobre a linhagem celular Saos-2 de osteossarcoma humano, Camilleri et al. (2004) concluíram que amostras endurecidas por 1 dia e amostras endurecidas por 28 dias, se comportaram diferentemente. Nas primeiras, a camada celular apresentou-se confluenta depois de 5 e 7 dias, enquanto nas amostras aplicadas aos 28 dias, a camada celular estava com incompleta confluência. Neste grupo, observaram poucas células sobre o MTA branco. Os autores comentaram que, provavelmente, a

liberação de Ca, formando Ca(OH)_2 , que ocorre no início da reação do silicato tricálcio é alta e, assim, deve ser a responsável pela biocompatibilidade do MTA, diminuída aos 28 dias, quando a quantidade de Ca(OH)_2 disponível é menor. Observaram, também, que a superfície do MTA branco é mais áspera, provavelmente pela presença do alusilicato. Sobre este e sobre o óxido de bismuto, isolados, não houve crescimento celular.

Faraco Jr. e Holland (2004) buscando a resposta da polpa dental de cães ao capeamento direto com MTA branco, executaram exposições em 15 dentes. Os animais foram sacrificados aos 60 dias. Houve selamento da exposição pulpar em todas as amostras e todas as polpas estavam vitais. Foi observada inflamação pulpar em 2 casos. Os autores concluíram que o MTA branco possui as características necessárias para um capeador pulpar.

Main et al., em 2004, avaliaram a taxa de sucesso clínico do vedamento de perfurações radiculares em longo prazo, através da avaliação de 16 pacientes tratados na Universidade de Loma Linda. Foram examinadas 3 radiografias de cada dente (pré-operatória, pós-operatória e controle após 1 ano) por 3 avaliadores, para determinar a presença ou ausência de qualquer alteração patológica no local da perfuração. O período de reparo variou de 12 a 45 meses, ocorrendo em todos os casos. Os autores ressaltaram a importância da preservação em longo prazo, demonstrando, clinicamente, as respostas dos tecidos perirradiculares ao selamento das perfurações MTA.

No intuito de melhorar a manipulação do MTA, Rallis et al. (2004) testaram a biocompatibilidade da mistura MTA / lubrificante à base de água (KY Jelly). Esta mistura melhora a consistência e facilita a manipulação do material. Os fibroblastos do LPD, em meio de cultura, foram expostos aos extratos das misturas MTA / KY e

MTA/ água e avaliados em 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pela medida da atividade enzimática mitocondrial, comparando-a com as das células expostas somente ao meio. A mistura MTA / KY demonstrou similar biocompatibilidade a do MTA / água.

Bozeman et al. (2004) apresentaram um estudo, em 2 partes, comparando as características da dissolução dos elementos dos MTA cinza, MTA branco e um experimental chamado Dentalcrete. Parte A: 3 amostras circulares foram suspensas em 40 ml de água desionizada. A água foi coletada em 6 tempos: 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias e analisada. O MTA cinza e o branco liberaram, estatisticamente, a mesma quantidade de cálcio, que foi superior a do Dentalcrete. Parte B: 12 amostras para cada um dos 3 materiais, foram suspensas em 40 ml de solução tamponada de fosfato (sem cálcio) por 40 dias. Os resultados demonstraram a formação de cristais semelhantes à HA sobre as amostras de MTA, sendo a maior sobre o MTA cinza.

Koulaouzidou et al. (2005) verificaram o efeito antiproliferativo do Pro-Root® MTA, do IRM e do cimento de ionômero de vidro (Fuji II) sobre cultura de fibroblastos de 3 linhagens: BHK21/C13, L929 e RPC-C2A. Após 48 horas da manipulação, foram inseridos nos recipientes com as culturas, sobre uma membrana porosa (poros com 0,4 μ de diâmetro). Após 12, 24 e 48 h, as células sobreviventes foram contadas. Ficou claramente demonstrado o alto efeito antiproliferativo do IRM, desde 12 h até o final do experimento. Ao contrário, o MTA e o cimento de ionômero de vidro inibiram menos que 20% das células, após 48 h de exposição, provando assim sua biocompatibilidade.

Asgary et al. (2005) analisaram, por microanálise eletrônica, o MTA cinza e o MTA branco. Encontraram como principais componentes e em níveis comparáveis, nos dois tipos: óxido de cálcio (CaO), sílica (SiO₂) e óxido de bismuto (Bi₂O₃). As

diferenças estavam nas concentrações de Al_2O_3 (+122%), MgO (+130%) e especialmente FeO (+1000%) no MTA cinza.

Hernandez et al. (2005) compararam o percentual de apoptose e o perfil do ciclo celular entre as misturas MTA branco/ clorexidine 0,12% e MTA branco/ água destilada. Utilizaram cultura de células – fibroblastos gengivais e macrófagos de ratos, em 2 tempos: material recém manipulado e após 24 horas, colocando-os sobre dispositivos cujo fundo era uma membrana porosa, impedindo o contato físico direto. A intenção era imprimir maior potencial antibacteriano ao MTA. A partir dos resultados, concluíram que a clorexidine aumentou a citotoxicidade do MTA. Além disso, sugeriram que esta mistura afeta a regeneração dos tecidos periodontais, já que este processo é parcialmente dependente da proliferação local dos fibroblastos e macrófagos. Por outro lado, a mistura MTA branco/ água destilada provou não ser citotóxica, nem recém manipulada e nem depois de seu endurecimento.

Sarkar et al. (2005) estudaram o MTA quanto à sua formação físico-química e a natureza das interações deste material com um fluido tissular sintético (STF). Seis amostras de MTA (0,25g) preparado com água destilada (1ml) foram colocadas em recipientes plásticos, adicionados 10 ml de STF para cada amostra. Após 3 dias, em 37° C, o 1º grupo de 3 amostras foi retirado e as soluções e os precipitados, analisados. Ao final de 2 semanas, as 3 amostras restantes foram analisadas através de MEV , análise de energia dispersiva por raios X (EDXA) e difração por raios X (XRD). Este trabalho revelou que os precipitados continham principalmente O, Ca e P, e uma posterior análise XRD registrou presença de hidroxiapatita. A observação das interfaces MTA-dentina chamou atenção para a firme aderência desta camada às paredes de dentina, sem espaços. Os autores discutiram que, embora o P não esteja presente no MTA, quando este é submetido ao ambiente

biológico, o principal íon dissociado é o Ca, ocorrendo a formação de hidroxiapatita. Concluíram, então, que o MTA não é um material inerte em um ambiente oral simulado – ele é bioativo.

Também em 2005, Nakayama et al. realizaram um experimento com MTA e IRM sobre cultura de células de rato, de linhagem osteoblástica, para diferentes observações, variando os métodos, por 3 dias. O grupo controle continha apenas as células e o meio. Os resultados para o MTA foram os seguintes: a liberação de íons foi máxima para o cálcio e sílica (130 e 80 ppm) e imperceptível para fósforo, bismuto e alumínio; o pH da cultura, com o MTA, passou de 7,2 para 7,5; quanto à morfologia, as células permaneceram normais; em número, as células aumentaram, porém em taxa menor do que no grupo controle; a atividade da fosfatase alcalina aumentou dia-a-dia; a expressão do colágeno tipo I, foi significativamente menor do que o controle e quanto às proteínas relacionadas com o metabolismo ósseo, osteopontin (OPN) e osteocalcin (OCN), a OPN apareceu em nível significativamente maior que no controle. Concluíram que o MTA é um material de baixa citotoxicidade e que em sua presença a atividade osteoblástica das células foi suprimida, mas aceleraram-se suas funções como células fibroblásticas. Comentaram, ainda, que isto provavelmente ocorreu devido ao curto tempo do estudo.

Ribeiro et al. (2005) estudaram a citotoxicidade do MTA Angelus® e dos cimentos Portland cinza e branco, em cultura de células de linfoma de rato. Utilizaram o método de exclusão com azul de Trypan e concluíram que nenhum dos 3 cimentos induziram morte celular.

Menezes et al. (2005) descreveram um caso clínico onde uma perfuração radicular iatrogênica localizada acima da crista óssea foi vedada com MTA. Após 1

mês, o paciente mostrou-se assintomático, não mais havia edema, bolsa periodontal ou mobilidade. Após 15 meses, a região apresentava-se normal.

Miranda e Miranda (2005) relataram um caso clínico de tratamento de perfuração radicular, utilizando o MTA. A paciente apresentava fístula na mucosa vestibular do pré-molar superior esquerdo, sinalizando o acidente ocorrido em tratamento endodôntico antigo. Realizado o diagnóstico, a perfuração foi selada com ProRoot™ MTA cinza. Após vinte e seis meses de controle clínico e radiográfico, a região evidenciou sucesso clínico com reparo ósseo.

Em trabalho recente, Shahi et al. (2006) implantaram tubos de polietileno contendo MTA cinza, MTA branco e amálgama em dorso de ratos e compararam as respostas inflamatórias do tecido conjuntivo aos materiais. Os períodos avaliados foram 3, 7 e 21 dias. Em 3 dias, a resposta ao MTA cinza foi mais severa que a do branco, mas depois de 1 semana se inverteu. Relacionaram o fato com a presença do óxido de ferro no MTA cinza. Presumiram que após 1 semana, este composto foi eliminado pelo processo inflamatório, quando se reduziu, substancialmente, a severidade da inflamação.

Al-Rabeah, Perinpanayagam e MacFarland (2006) avaliaram a resposta de células ósseas humanas ao MTA (ProRoot™) cinza e branco, misturados com água destilada e com anestésico local. Discos do material foram colocados em uma placa de 24 poços e as células semeadas sobre eles, com MEM trocado a cada 4 dias. Foram observadas nos períodos de 1, 7 e 14 dias, sob MEV. Encontraram células fixadas e distribuídas sobre as superfícies no primeiro dia e proliferadas, formando uma camada, em 7 dias. Aos 14 dias esta camada era espessa quase cobrindo toda a superfície, similarmente, em todos os espécimes.

Bramante et al. (2006) trataram um caso de perfuração radicular de incisivo lateral superior, com lesão e extravasamento de guta percha na área. Após 1 ano do retratamento endodôntico e selamento da perfuração com MTA, o dente apresentou-se assintomático e, radiograficamente, com reparo tecidual.

2.2.2 MBPc

Por ser um cimento experimental e não ter vasta literatura a seu respeito, se fez necessária uma revista da literatura no que tange à toxicidade de seus componentes, hidróxido de cálcio e resina epóxica, que estão presentes em outros cimentos obturadores do sistema de canais radiculares.

Briseño e Willershausen (1991) testaram dois cimentos resinosos, AH26 e Diaket, e um à base de silicone, endurecidos por 24 h e 48 h, em vários períodos até 21 dias. Utilizaram culturas de fibroblastos gengivais humanos. O AH26 demonstrou severa toxicidade nos 2 grupos, enquanto o Diaket mostrou-se um pouco melhor tolerado, principalmente no grupo de 48 h. Os autores comentaram que a toxicidade destes cimentos não diminuiu proporcionalmente ao tempo de endurecimento, e, portanto, podem ser irritantes aos tecidos periapicais por um período de tempo maior.

Estrela et al. (1995) analisaram os mecanismos de ação dos íons Ca e hidroxila do Ca(OH)_2 , destacando duas importantes propriedades: a inativação das enzimas bacterianas - efeito antibacteriano e a ativação enzimática dos tecidos - efeito mineralizador. Este efeito pode ser observado pela ação da enzima fosfatase alcalina, que favorece a mineralização quando ativada pelo Ca(OH)_2 . O pH ótimo para esta ativação é de 8,6 a 10,3.

Siqueira Jr. et al. (1995 apud LOPES e SIQUEIRA Jr., 2004) estudaram 4 cimentos à base de Ca(OH)_2 e verificaram que foram capazes de alcalinizar o meio, mesmo depois de endurecidos. O Sealer 26, mesmo sendo um cimento com resina epóxica, mostrou que a trama resinosa não impediu a difusão do medicamento. Acreditam que o Ca(OH)_2 não participa da reação de presa, ficando embebido na malha resinosa. Assim, a sua liberação dependerá do grau de condensação e compactação desta malha e, possivelmente, da natureza hidrofílica da matriz.

Busato, Costa e Estrela (1997) relataram que o hidróxido de cálcio é uma base forte obtida da calcinação do carbonato de cálcio que se transforma em óxido de cálcio. A hidratação deste resulta no hidróxido de cálcio, um pó branco com um alto pH (12,6). Suas propriedades vêm da sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, e a ação destes íons sobre tecidos e bactérias explica as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância.

Osorio et al. (1998) mediram a citotoxicidade dos cimentos obturadores de canais radiculares Endomet (à base de óxido de zinco e eugenol), CRCS (com hidróxido de cálcio) e AH26 (resinoso). Utilizaram culturas celulares da linhagem L929 e culturas de fibroblastos gengivais humanos. Todos os materiais testados foram citotóxicos, sendo o CRCS o menos citotóxico dos cimentos endodônticos.

Willershausen et al. (2000) testaram a sensibilidade de 2 linhagens celulares primárias e 1 permanente à toxicidade de cimentos endodônticos. As células foram semeadas sobre os materiais por 6 dias, para determinar viabilidade, proliferação e presença de proteínas celulares. Todos os materiais inibiram o crescimento celular. Para avaliarem o potencial inflamatório dos cimentos, mediram a liberação de prostaglandinas (PGE_2), em exposição de 30 min. Confirmaram que os cimentos à base de Ca(OH)_2 têm, em geral, baixo efeito citotóxico, mas que, inicialmente,

houve grande liberação de PGE₂. Isto se deve ao alto pH gerado pela liberação do Ca. Após o endurecimento, a redução foi significativa. Observaram maior sensibilidade das linhagens primárias.

Azar et al. (2000), trabalharam *in vitro* com os cimentos AH26, AH Plus e ZOE, sobre cultura celular. Mostraram que, após intervalos de tempo de 1h a 5 semanas, o AH26 foi o mais citotóxico até o final da primeira semana, havendo redução após este período. Os efeitos mais severos ocorreram até 48h. Afirmaram que isto aconteceu devido à liberação de formaldeído, que é muito grande desde a manipulação até as 48 h. O AH Plus mostrou severa citotoxicidade somente até 4 h.

Cohen et al. (2000) determinaram a citotoxicidade do AH26 e do AH Plus através de teste de difusão em agar, em cultura de células L929. As culturas expostas aos discos dos cimentos, por 48 h, exibiram severa reatividade (grau 4). Os dois materiais possuem resina epóxica e, portanto, liberam formaldeído como resultado da reação de endurecimento.

Tai, Huang e Chang, em 2001, realizaram um estudo com duas culturas primárias de fibroblastos humanos (gengiva e mucosa oral) e uma de linhagem permanente de fibroblasto de hamster (V79). Os extratos de 3 cimentos endodônticos, entre eles o AH Plus, foram testados nas 3 culturas, através do método colorimétrico MTT, em 1 e 3 dias. Todos os cimentos foram citotóxicos, porém não foi observada diferença nas respostas entre as culturas primárias e a permanente. De acordo com o fabricante, o AH Plus não libera formaldeído, entretanto, os autores afirmaram que sua citotoxicidade deve estar ligada à resina epóxica presente em sua fórmula.

Huang et al. (2002) testaram a citotoxicidade de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, de resina epóxica (AH26 e AH Plus) e de hidróxido de cálcio

(Sealapex), através do método colorimétrico MTT, sobre células humanas de LPD e fibroblastos de hamster (V79). Todos os cimentos mostraram algum grau de citotoxicidade, mas o Sealapex foi o menos tóxico sobre as 2 culturas celulares. Os resinosos apresentaram significativa inibição do crescimento celular no 1º dia, que foi reduzida, consideravelmente, no 2º dia. As células se mostravam semelhantes ao controle no tempo final de 7 dias.

Schwarze et al. (2002), através do método *in vitro* XTT (metabolismo mitocondrial pelo sal tetrazolium), avaliaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos em culturas de células primárias de fibroblastos do LPD e linhagem permanente 3T3. Foram utilizados extratos imediatamente após manipulação, com 1, 5 e 24 h. O cimento à base de Ca(OH)_2 não foi citotóxico. O cimento à base de resina epóxica, AH Plus, somente inibiu, moderadamente, a atividade mitocondrial imediatamente após manipulação e em 1 h. Nos tempos seguintes, mostrou-se não citotóxico.

Silva Neto e Moraes (2003) compararam *in vitro* a capacidade seladora proporcionada pelo MBPc, MTA-Angelus®, ProRoot™ MTA e Super-EBA, com e sem o uso de matriz de gesso Paris no fundo do trajeto das perfurações, criadas na região de furca de molares humanos extraídos. Através de infiltração de Rhodamine B 0,2%, detectaram os menores índices de infiltração através do cimento MBPc, com ou sem a matriz de gesso, embora esta tenha influenciado negativamente o selamento.

Lopes e Siqueira Jr. (2004) descrevendo as propriedades biológicas dos materiais obturadores, consideraram que a biocompatibilidade de um material obturador depende diretamente de seus componentes, de seu tempo de endurecimento e de sua solubilidade, e, ainda, que embora a maioria dos cimentos

apresente níveis variados de citotoxicidade, usualmente perde esta condição após o endurecimento. Quanto à ação do Ca(OH)_2 , relatam que é necessário que este seja liberado da massa obturadora para que exerça sua propriedade terapêutica, alcalinizando o meio.

Huang et al. (2004) utilizaram o brometo tetrazolium (MTT) para analisar a citotoxicidade de um cimento resinoso (AH Plus®) e um à base de Ca(OH)_2 (Sealapex®), sobre células humanas de câncer oral (OC2). As culturas foram semeadas em placas de 96 poços e expostas a 5 diluições seriadas de cada material: pasta A e pasta B; base e catalisador; cimentos recém-manipulados e cimentos endurecidos a 24 h . Afirmaram que a toxicidade do AH Plus® é proveniente da resina epóxica (maior toxicidade da pasta A). Comentaram que o Sealapex® foi também usado, na década de 80, para obturação de perfuração, devido aos benefícios do Ca(OH)_2 . A maior toxicidade deste cimento ocorreu no grupo recém-manipulado, devido ao seu alto pH neste momento. Fizeram uso do método de fragmentação do DNA para observar o mecanismo da morte celular e concluíram que é por necrose e não por apoptose.

Queiroz et al. (2005) avaliaram a citotoxicidade de 2 cimentos endodônticos, Topseal e Sealer 26, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. Mediram a produção de óxido nítrico pelas células em contato com soluções dos cimentos. Estes cimentos possuem resina epóxica em sua formulação, sendo que o Sealer 26 também possui hidróxido de cálcio (37%). A produção de óxido nítrico frente ao Sealer 26 foi significativamente superior ao Topseal. Considerando que as células em condições de agressão produzem maior quantidade de óxido nítrico, o cimento Sealer 26 determinou maior citotoxicidade que o Topseal, ainda que

contenha hidróxido de cálcio, isto provavelmente deve-se aos subprodutos de sua reação de polimerização.

Os métodos MTT e PCR foram utilizados para avaliar a citotoxicidade dos cimentos Top Seal e AH26, por Huang e Chang (2005). As células osteoblásticas humanas da linhagem U2OS foram as selecionadas. Para elucidar os efeitos patobiológicos dos cimentos à base de resina epóxica, adicionaram antioxidantes e um precursor da glutathione (GSH), *N*-acetil-L-cisteína (NAC). Estes, possivelmente, reduzem a indução da enzima COX-2, responsável por desencadear o processo inflamatório celular (síntese de prostaglandinas). O resultados mostraram que os 2 cimentos foram citotóxicos nas diluições e dose-dependentes, sendo o AH26 mais do que o Top Seal. Observaram, também, que a adição de NAC extracelularmente, evitou a síntese da COX-2. Sugeriram que este é o mecanismo de inflamação *in vivo* gerada pelos cimentos à base de resina epóxica.

Silva Neto et al. (2005) compararam, *in vitro*, a capacidade seladora dos cimentos MTA e o experimental MBPc, em obturações retrógradas. Realizaram tratamento endodôntico, apicetomia e preparo de cavidade retrógrada em 34 incisivos centrais superiores humanos, e obturaram-nas com MTA Angelus®, ProRoot™ MTA e MBPc. Foram, então, imersos em solução aquosa de Rhodamine B a 0,2% e mantidas em estufa a 37º C por 48 horas. Para a leitura da magnitude das infiltrações, utilizaram microscópio óptico com ocular micrométrica. O grupo do MBPc apresentou valores de infiltração menores do que os grupos do MTA, que não apresentaram diferença significativa entre si. Os autores afirmaram a necessidade de ensaios de compatibilidade biológica, para a avaliação do comportamento dos tecidos frente ao material experimental, complementando estes resultados.

Cintra et al. (2006) avaliaram, qualitativa e quantitativamente, a resposta inflamatória a implantes de tubos de polietileno com MBPc e MTA, em alvéolos de ratos. Após 7, 15 e 30 dias, as peças foram analisadas histologicamente. Aos 7 dias, os tecidos em contato direto com o MTA mostraram reação inflamatória branda com necrose de coagulação; aos 15 dias, exibiram áreas basofílicas, provavelmente antecedendo a mineralização, vista aos 30 dias. Com o MBPc, aos 7 e 15 dias, as áreas adjacentes mostraram moderado infiltrado inflamatório, com macrófagos e linfócitos, e formação de novos vasos e poucos fibroblastos jovens; linhas hemorrágicas e fragmentações nucleares foram notadas entre o material e o tecido conjuntivo, provavelmente devido a interação entre este e o componente resinoso do cimento; aos 30 dias, novo osso formou-se, muitas vezes junto ao material. O processo de cura tecidual não estava completo em nenhum dos grupos, ao final do experimento.

Bouillaguet et al. (2006) testaram a resposta biológica a cimentos resinosos endodônticos atuais, dentre eles um epóxico – o AH Plus. Através do método MTT, a resposta das células 3T3 foi avaliada em 24 e 72 h. A citotoxicidade deste cimento foi moderada em 24 h, mas aumentou em 72 h. O mesmo ocorreu com os outros cimentos resinosos testados.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Esta linha de pesquisa vem ao encontro da expectativa mundial no que tange a eleição de métodos alternativos em testes de biomateriais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, em cultura de células L929, a citotoxicidade dos cimentos reparadores de perfuração radicular ProRoot™ MTA cinza, MTA Branco Angelus® e o cimento experimental MBPc, através do método da difusão em agar com o corante vermelho neutro, e comparar as alterações morfológicas celulares ocorridas frente aos três cimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Cimentos

Para este estudo, foram utilizados três cimentos obturadores de perfuração radicular, o ProRoot™ MTA cinza (Dentsply - Tulsa dental, Paris/ França), o MTA Branco Angelus® (Angelus Soluções Odontológicas - Londrina/ Pr, Brasil) e o experimental MBPc, desenvolvido na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, pelos professores Ivaldo Gomes de Moraes e Alceu Berbert (Figura 1).

Suas fórmulas estão dispostas na Tabela 1, conforme informações dos fabricantes.

O ProRoot™ MTA cinza e o MTA Branco Angelus® foram utilizados na proporção de 1 parte de pó para 1 parte de líquido. O pó foi incorporado ao líquido, formando um cimento arenoso. Segundo os fabricantes, o tempo de endurecimento do ProRoot™ MTA é de 2 h e 45 min e do MTA Branco Angelus®, de 15 min.

O MBPc foi manipulado na proporção de 3 partes da pasta base (0,6 g) para 1 parte da pasta catalisadora (0,2 g), obtendo-se um cimento plástico. Seu tempo de endurecimento inicial, segundo seus idealizadores, é de 2 h e 30 min e o final, de aproximadamente 4 h.

Os cimentos foram manipulados em placas de vidro com espátula nº 24, estéreis, sob condições assépticas.

CIMENTO	APRESENTAÇÃO	FÓRMULA
MTA (cinza) (ProRoot™-Dentsply Tulsa Dental, Paris/ França)	Pó	-Silicato tricálcio; aluminato tricálcio; óxido tricálcio; aluminoferrato tetracálcio; óxido de silicato; óxido de bismuto; sulfato de cálcio.
	Líquido	-Água destilada
MTA Branco (Angelus®- Londrina/ Pr – Brasil)	Pó	- Dióxido de silício (SiO ₂); óxido de potássio (K ₂ O); alumina (Al ₂ O ₃); óxido de sódio (Na ₂ O); óxido férrico (Fe ₂ O ₃); trióxido de enxofre (SO ₃); óxido de cálcio (CaO); óxido de bismuto (Bi ₂ O ₃); óxido de magnésio (MgO) e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio).
	Líquido	-Água destilada
MBPc (USP- Bauru)	Pasta Base	-Resina epóxica; subnitrito de bismuto e hidróxido de cálcio.
	Pasta Catalisadora	-Sulfato de bário, subnitrito de bismuto; endurecedor para resina epóxica e polioli de poliuretana vegetal de mamona.

Tabela 1. Fórmula dos cimentos, segundo informações dos fabricantes.

4.1.2 Linhagem celular

A linhagem de células L929, de fibroblastos de camundongos, foi a selecionada para esta pesquisa (Figura 2). É uma linhagem permanente obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e cedida pelo Setor

de Cultura de Células – Departamento de Imunologia INCQS/ FIOCRUZ, onde se realizou este experimento.



Figura 1. Cimentos selecionados para o experimento.

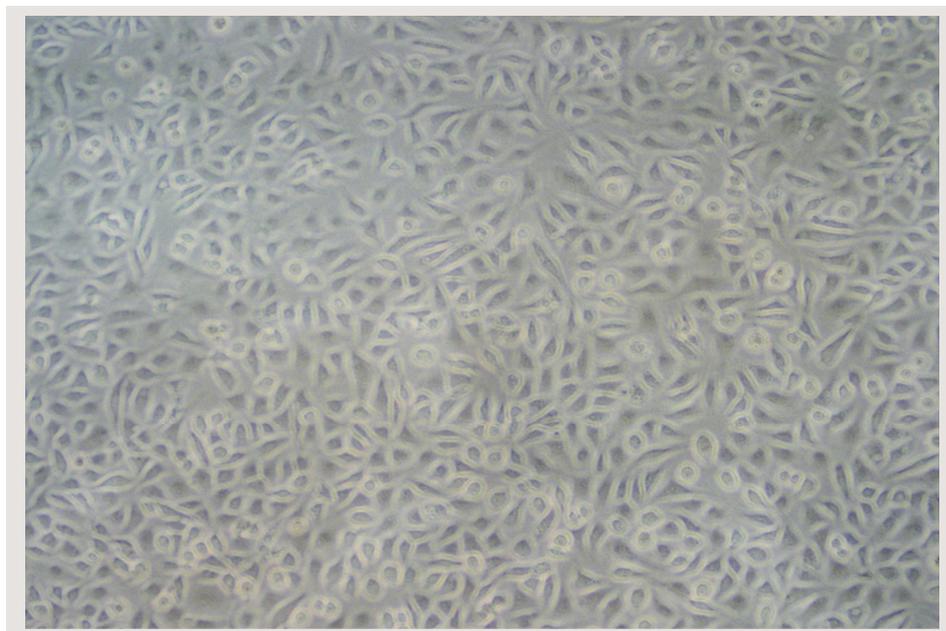


Figura 2. Monocamada de células L929, em aumento 100X, antes da aplicação do corante.

4.2 Métodos

A metodologia empregada neste estudo foi desenvolvida de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado (POP) do INCQS/ FIOCRUZ.

4.2.1 Preparo da cultura celular

As células ficam estocadas em reservatórios de nitrogênio líquido, congeladas a -70° C em MEM 1 X concentrado com glicerol. Para o uso, foram descongeladas, transferidas para as garrafas de cultura com MEM completo e subcultivadas. O número da passagem foi 99. Assim, ficaram 48 h em estufa umidificada, a 37° C com 5% de CO_2 , para o preparo da suspensão celular na concentração de 2×10^5 células/ ml. Foram pipetados 4 ml desta suspensão em cada poço (3,5 cm de diâmetro) das placas de 6 poços (Costar®), em meio Dulbecco's com 5% de soro fetal bovino (SFB). Estas placas permaneceram em estufa, a 37° C com 5% de CO_2 , por 48 h, para permitir a adesão e a confluência da monocamada celular. A viabilidade celular mínima para a realização do ensaio foi de 85%. Esta fase do procedimento foi realizada pelos técnicos do Laboratório de Cultura Celular do INCQS/ FIOCRUZ (ANEXOS A e B).

É fundamental a observação da cultura celular antes do início do ensaio, pois alterações morfológicas ou sinais de contaminação determinariam o seu descarte. Através do microscópio invertido, as culturas foram examinadas e confirmou-se a ausência de contaminação e a saúde celular, com confluência da monocamada. A confluência é alcançada quando toda a área disponível para o crescimento é tomada

e as células mantêm contato entre si, do que depende a reprodutibilidade dos ensaios de reatividade biológica *in vitro*.

Para o registro das imagens, foi utilizado o filme Kodak Gold ASA 100 na máquina NiKon FDX 35, acoplada ao microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 (Figura 3).

4.2.2 Preparo das amostras

Seis orifícios foram cortados com um aro metálico de 6 mm de diâmetro, em uma lâmina de cera 7 sobre outra, para estabelecer a espessura. Neste molde se verteu gesso para a obtenção de um modelo (Figura 4a). Sobre este modelo foram confeccionadas placas, aplicando-se a base leve do silicone Adsil® (Coltène/Vigodent) pressionada com uma placa de vidro, até a presa deste material (Figura 4b). As placas de silicone foram esterilizadas em autoclave Dabi Atlante, no ciclo de 6 min. Imediatamente após a manipulação, os cimentos foram colocados nos orifícios para endurecerem. Desta maneira, as amostras dos cimentos foram padronizadas com 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro. As três placas aguardaram 48 h, embaladas, o momento da aplicação dos cimentos no ensaio (Figura 5).



Figura 3. Microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100, com máquina Nikon FDX 35 acoplada.

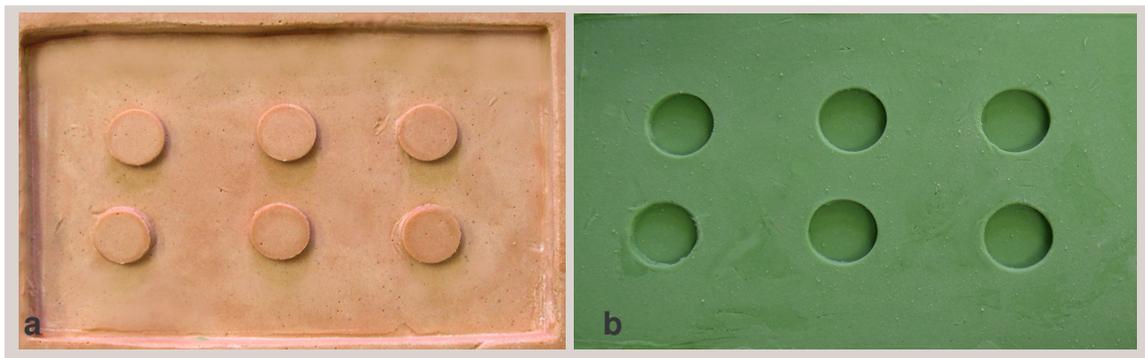


Figura 4. a) molde de gesso; b) placa de silicone para a confecção de amostras com 6 mm de diâmetro x 1 mm de espessura.



Figura 5. Placa com o cimento aplicado.

4.2.3 Método de difusão em agar

As placas de 6 poços, com monocamada celular uniforme, foram levadas para a capela de fluxo laminar vertical, onde preferivelmente trabalha-se sem luvas para que se retenha melhor a sensibilidade (FRESHNEY, 2000). O meio de cultura foi aspirado com pipeta e procedeu-se a lavagem dos poços, com 2 ml de solução fosfatada básica (PBS). Logo após, esta solução também foi aspirada para a colocação de 1 ml do meio de cobertura em cada poço (Figura 6). Este meio é composto pelo agar a 1,8%, adicionado do corante vermelho neutro a 0,01% e MEM 2X concentrado, em quantidades iguais (ANEXO B). O agar e o meio estavam em banho-maria à 44°C. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 min, aguardando a solidificação do agar, à temperatura ambiente (Figura 7).

No momento do uso, as embalagens com as amostras e os frascos com os controles positivos e negativos estéreis foram abertos na capela de fluxo laminar. As amostras, em triplicata, e os controles foram colocados com pinças cirúrgicas, delicadamente, no centro do agar (Figura 8).

Para o controle celular, o primeiro poço recebeu apenas o meio de cobertura. Para o controle negativo, foi utilizado o teflon como material inerte e para o controle positivo, o látex para garrote por ser biologicamente reativo, de acordo com as condições do ensaio (Figuras 9 e 10). Dessa forma, as placas foram embrulhadas em papel de alumínio, para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro (ISO 10993-5). Foram, assim, levadas à estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 24 h, para o ensaio da citotoxicidade (Figura 11).

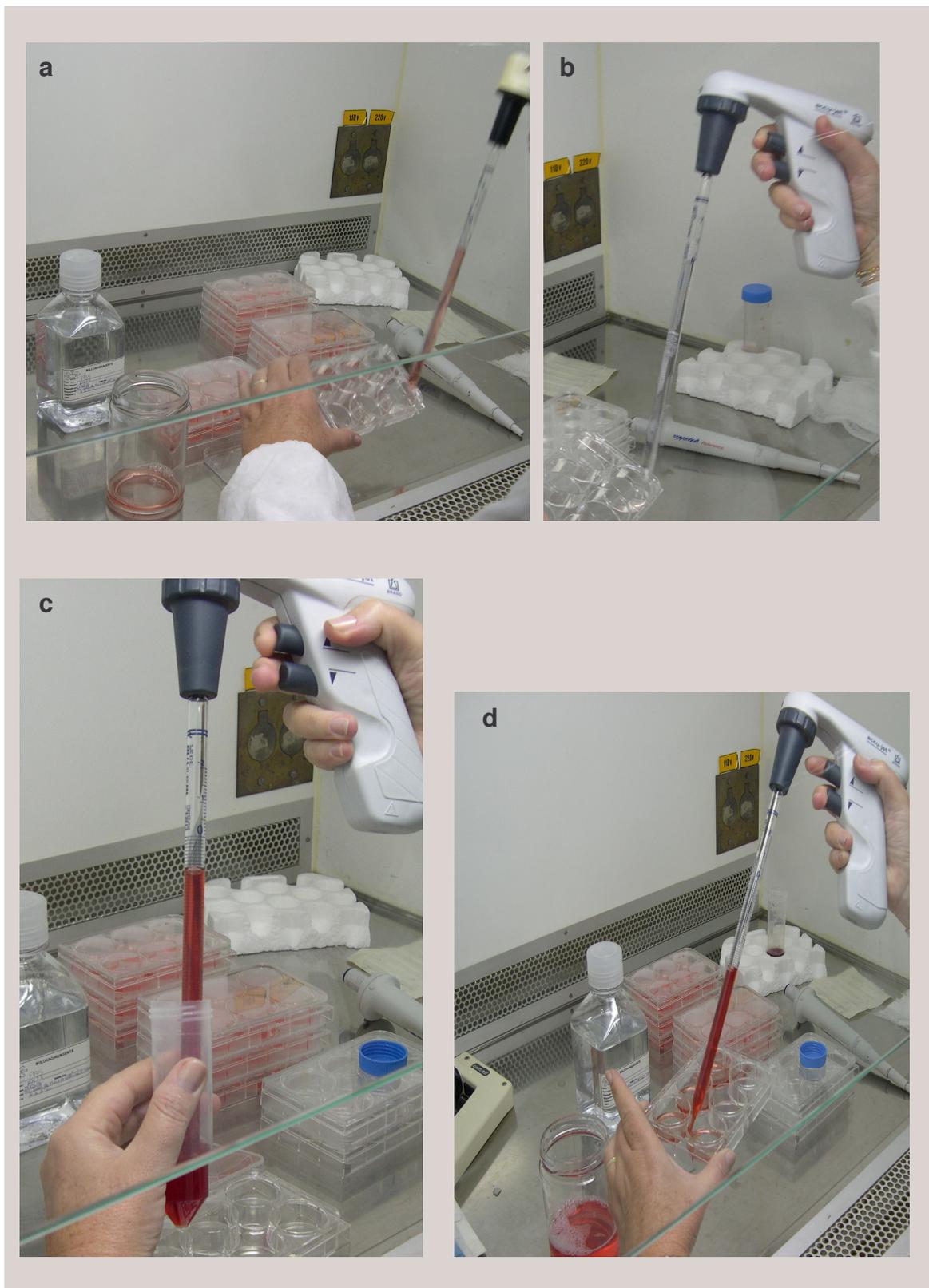


Figura 6. a) remoção do meio de cultura dos poços; b) lavagem com PBS; c) aspiração do agar; d) colocação de 1 ml deste sobre as monocamadas celulares.



Figura 7. As placas na capela de fluxo laminar vertical, aguardando a solidificação do agar.



Figura 8. Colocação do controle positivo sobre o agar.

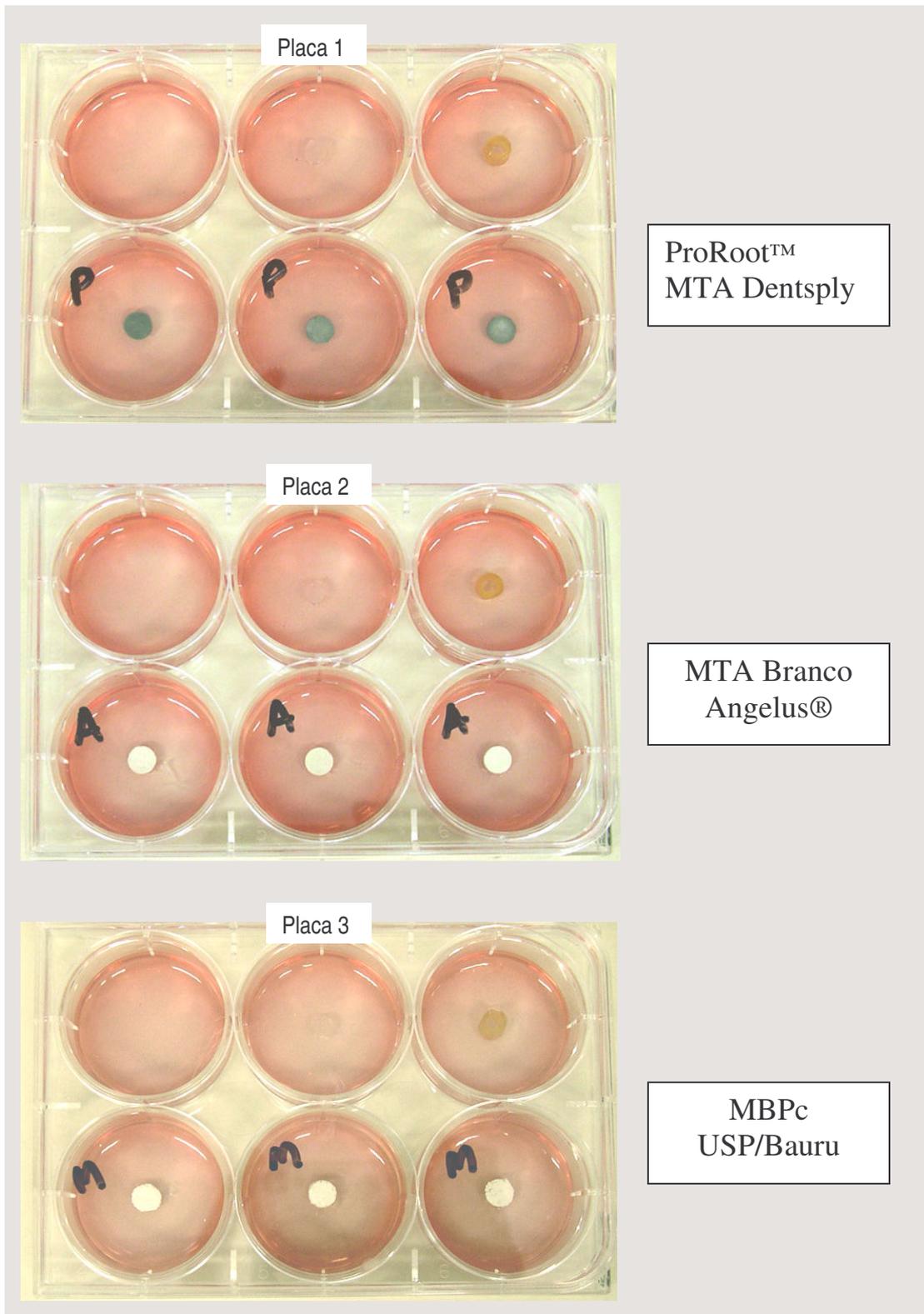


Figura 9. Placas de 6 poços com os controles celular, negativo e positivo e as amostras testadas.

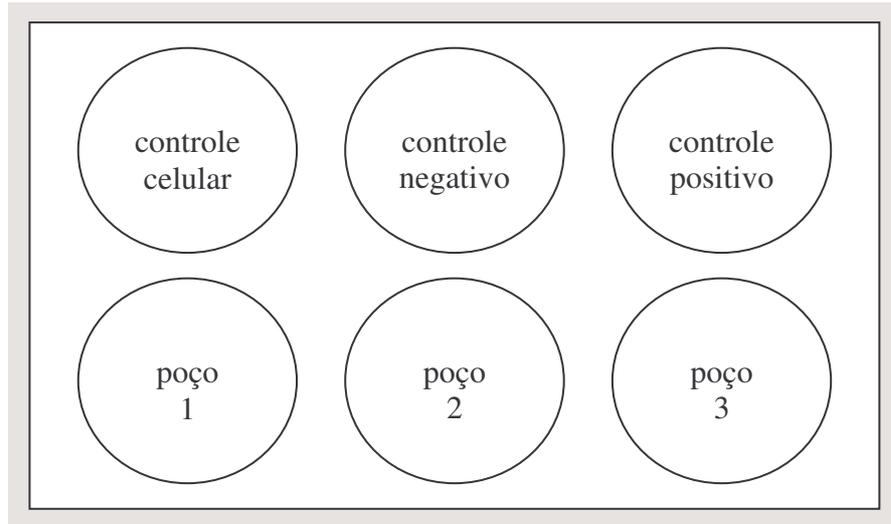


Figura 10. Esquema das placas de 6 poços.



Figura 11. Placas embrulhadas em alumínio e levadas à estufa a 37°C com 5% de CO₂ no ar.

4.2.4 Coleta de dados

Após a incubação de 24 h, os poços foram macroscopicamente observados e um halo claro se formou ao redor das amostras e dos controles positivos, relativos à citotoxicidade dos espécimes. A extensão da área descorada foi medida, por quadrante, a partir das amostras, conforme o POP/FIOCRUZ. Esta medida foi realizada visualmente, através de transparências milimetradas sob as placas, e registradas. As placas foram, então, levadas para o microscópio invertido.

A partir da constatação da presença de halos, microscopicamente, em poços onde não havia sido possível sua identificação anteriormente, buscou-se uma forma de ampliar a visualização macroscópica, para a utilização de uma ferramenta digital de medição. Para tanto, os poços foram fotografados com a máquina digital Nikon Coolpix 4300 e transferidas para o computador, para a utilização do software Image Tool®. Com os recursos de magnificação de imagem deste programa, foi possível identificar melhor os limites das áreas em questão. A tela milimetrada serviu como calibragem para a ferramenta digital de medição, pois as fotos, embora possibilitem o melhor exame das áreas, carregam alguma alteração. Isto foi feito aplicando-se esta ferramenta sobre uma linha correspondente a 1 mm, na área limítrofe àquela a ser medida. O programa atribuía um comprimento em unidades digitais, denominadas pixel. Este resultado equivalia, então, a 1 mm. O procedimento era repetido 3 vezes para cada amostra, antes da efetiva medição. A extensão do halo produzido pelas amostras, por quadrante, foi, novamente, registrada.

O halo corresponde, microscopicamente, a uma zona de células descoradas, onde houve liberação do corante vermelho neutro, compreendendo lise celular e células morfológicamente alteradas. Através do microscópio invertido, foram feitas

fotos de uma região de cada poço, nos aumentos de 40X e 100X. A partir daí, a extensão microscópica observada foi medida, com o mesmo software. Não houve necessidade de calibragem, pois a distância entre a placa e a objetiva era fixa. O número de pixels varia com a resolução e o tamanho das imagens, que foram usadas no tamanho 100% original (10 x 15 cm), com resolução de 300 dpi. Assim, o valor do pixel foi de 0,09 mm. Aplicou-se, então, a seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de pixels} \times 0,09 = \text{extensão do halo em mm}$$

O valor numérico resultante foi dividido pelo valor do aumento da imagem (40 ou 100) para que a medida correspondesse à realidade. Estas medidas foram interessantes para uma comparação com as medidas macroscópicas.

4.2.5 Avaliação da citotoxicidade

A metodologia empregada neste estudo fez uma avaliação quantitativa, através da extensão em mm dos halos, e qualitativa, a partir da interpretação dos resultados.

4.2.6 Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados, as médias finais das medidas obtidas para cada amostra foram aplicadas à tabela de grau de citotoxicidade, de acordo com o POP/ FIOCRUZ . Os controles foram submetidos à mesma tabela (Tabela 2).

Grau	Citotoxicidade	Zona de citotoxicidade
0	Ausência	Ausência de descoramento sob a amostra
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra
2	Branda	Zona de descoramento a partir da amostra até 0,5 cm
3	Moderada	Zona de descoramento a partir da amostra entre 0,5 e 1,0 cm
4	Severa	Zona de descoramento maior do que 1,0 cm, sem envolver a placa inteira

Tabela 2. Tabela de grau de citotoxicidade para a interpretação dos resultados do ensaio de difusão em agar, de acordo com o POP/ FIOCRUZ.

4.2.7 Determinação da validade do ensaio

A validade do ensaio foi determinada a partir das respostas das células ao tratamento pelos controles positivo e negativo, avaliadas macro e microscopicamente. O controle celular foi realizado através da observação microscópica dos poços de cultura que receberam somente o meio de cobertura.

4.2.8 Análise estatística

Cada ensaio foi feito em triplicata. Os resultados representaram as médias \pm os desvios padrões. A análise paramétrica dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) associada ao Tukey e através do teste *t* de Student não pareado, enquanto a não-paramétrica pelo Kruskal-Wallis, associado ao Tukey, utilizando o programa Graphpad Prism®, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4.2.9 Análise da morfologia celular

Inicialmente, a análise morfológica identificou as células viáveis, que são as que se mantiveram coradas após a exposição aos cimentos. Os aspectos celulares de forma, uniformidade do citoplasma e presença de núcleo, além da adesão e confluência da monocamada foram observados em 100X, 200X e 400X.

4.2.10 Limitações dos métodos

Por ser um método de avaliação de reações celulares, nem sempre o grau de citotoxicidade revelado para um material determinará a mesma reação nos tecidos, devido à sua incapacidade de determinar a interação entre estes e o material.

Os resultados provenientes da metodologia que utiliza o agar dependem da taxa de difusão das substâncias presentes nos materiais, de seus pesos moleculares e de sua solubilidade.

O método visual de medição dos halos também revelou limitações, quando o material foi levemente citotóxico.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A extensão das áreas descoradas por quadrante (Q), medida visualmente, se apresenta na tabela 3. As medidas obtidas através do software Image Tool® estão na tabela 4. As dos controles estão registradas nas tabelas 5 e 6.

Material: ProRoot™												
poço 1				poço 2				poço 3				
Extensão da área descorada em mm	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valores médios	0				0				0			
Média final: 0												
Material: MTA Branco Angelus®												
poço 1				poço 2				poço 3				
Extensão da área descorada em mm	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valores médios	0				0				0			
Média final: 0												
Material: MBPc												
poço 1				poço 2				poço 3				
Extensão da área descorada em mm	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	3,5	4,0	3,5	3,0	3,0	4,0	4,0	3,5	2,5	3,0	4,0	3,0
Valores médios	3,5				3,6				3,1			
Média final: 3,4 mm												

Tabela 3. Extensão das áreas descoradas nos poços das amostras, em mm, medida visualmente.

Material: ProRoot™												
	poço 1				poço 2				poço 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	0,35	0,20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valores médios	0,14				0				0			
Média final: 0,05 mm												

Material: MTA Branco Angelus®												
	poço 1				poço 2				poço 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	0	0	0	0	0	0,24	0,35	0	0,27	0,32	0	0
Valores médios	0				0,15				0,15			
Média final: 0,10 mm												

Material: MBPc												
	poço 1				poço 2				poço 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	3,3	3,8	3,7	3,2	3,5	4,1	4,4	3,6	2,4	3,3	4,3	2,6
Valores médios	3,5				3,9				3,15			
Média final: 3,5 mm												

Tabela 4. Extensão das áreas descoradas nos poços das amostras, em mm, medida através do software Image Tool®.

Material: controle +												
	placa 1				placa 2				placa 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	4,5	4,5	6,0	4,0	4,5	5,0	7,5	4,5	8,0	6,5	5,0	4,5
Valores médios	4,75				5,4				6,0			
Média final: 5,4 mm												
Material: controle -												
	placa 1				placa 2				placa 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valores médios	0				0				0			
Média final: 0												

Tabela 5. Extensão das áreas descoradas nos poços dos controles positivos (+) e negativos (-), em mm, medida visualmente.

Material: controle +												
	placa 1				placa 2				placa 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	4,4	4,3	5,6	4,4	4,2	4,8	7,4	4,7	7,8	6,13	5,4	4,6
Valores médios	4,7				5,3				6,0			
Média final: 5,3 mm												
Material: controle -												
	placa 1				placa 2				placa 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extensão da área descorada em mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valores médios	0				0				0			
Média final: 0												

Tabela 6. Extensão das áreas descoradas nos poços dos controles positivos (+) e negativos (-), em mm, medida através do software Image Tool®.

Após o tratamento dos dados pelo teste ANOVA e a identificação de pelo menos uma média diferente, aplicou-se o de comparação múltipla de Tukey (Figura 12). As médias obtidas pelos métodos de medição visual e através do software Image Tool® apresentam-se na tabela 7. O teste *t* de Student não pareado comparou estes métodos (Figura 13).

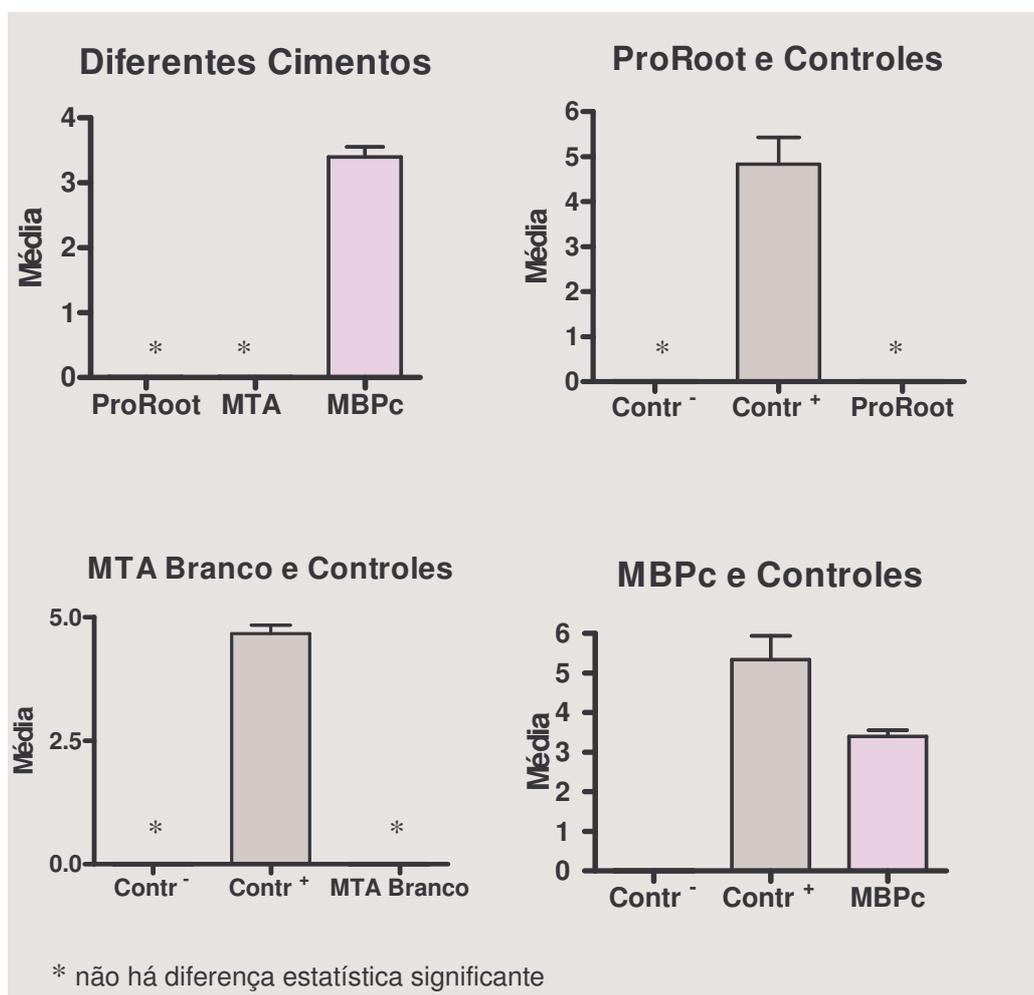


Figura 12. Representação gráfica das médias de extensão dos halos dos cimentos, comparando-os entre si e com os controles.

Amostras	Médias da extensão das áreas descoloradas	
	Visualmente	Software
ProRoot	0 ^{±0,00}	0,05 ^{±0,08}
MTA Branco	0 ^{±0,00}	0,1 ^{±0,09}
MBPc	3,4 ^{±0,26}	3,5 ^{±0,37}

$p > 0,05$

Tabela 7. Médias obtidas pelos métodos de medição visual e digital.

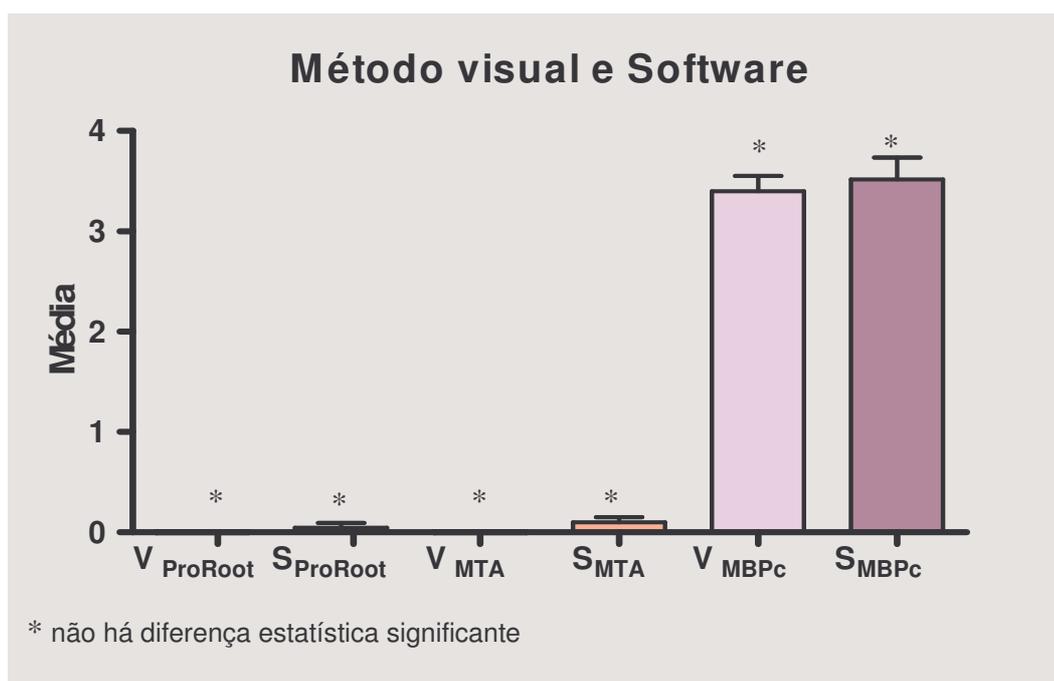


Figura 13. Representação gráfica das médias de extensão dos halos dos cimentos, comparando os métodos visual e digital.

5.1 Interpretação dos resultados

As médias finais das medidas realizadas visualmente e através do software Image Tool® foram aplicadas à tabela de grau de citotoxicidade (Tabela 2) para a qualificação dos resultados.

Pelo método visual, as amostras ProRoot™ MTA e MTA Branco Angelus® revelaram ausência de halo ao redor dos cimentos. Entretanto, ao removê-las, foi possível ver a área descorada sob elas, classificando estes cimentos com o grau 1 (leve). O cimento MBPc recebeu o grau 2 (branda).

Os resultados da medição digital evidenciaram halo em alguns quadrantes dos poços de ProRoot™ MTA e MTA Branco Angelus®, sem, contudo, alterar a sua graduação ($p > 0,05$). Ainda com este método de medição, o cimento MBPc recebeu o grau 2.

O controles (-) apresentaram citotoxicidade grau 0 (ausência), enquanto os controles (+) obtiveram grau 3 (moderada). Os controles celulares mantiveram-se inalterados, com confluência e viabilidade, até o final do experimento. Assim, confirmou-se a validade do ensaio.

Após a qualificação, o teste Kruskal-Wallis confirmou haver diferença estatística significativa entre as amostras e o Tuckey confirmou os resultados anteriores.

A visualização, macro e microscópica, dos poços está exemplificada nas figuras 14, 15 e 16.

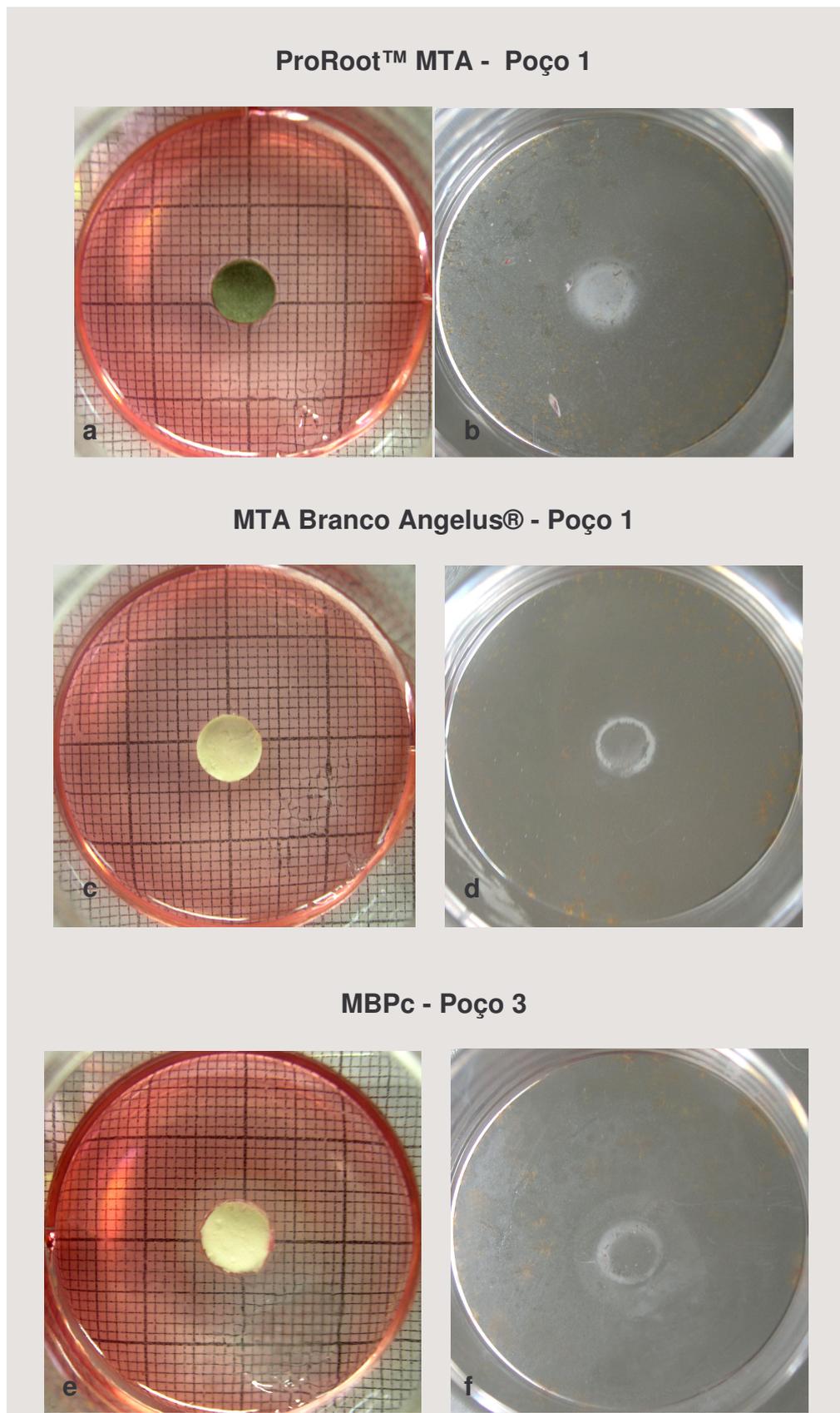


Figura 14. a, c, e) visão macroscópica do poço; b, d, f) poço sem amostra e sem agar.

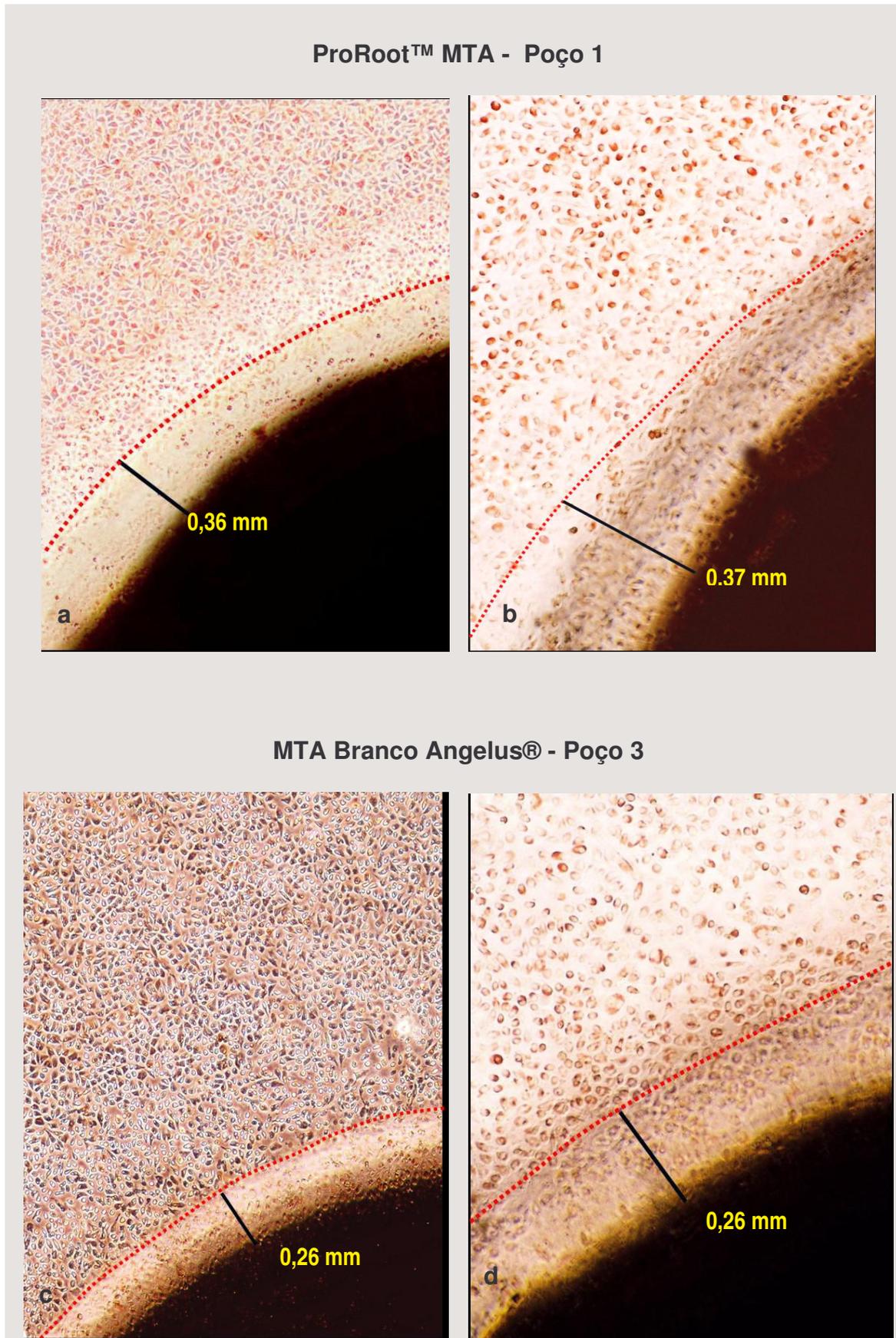


Figura 15. a, c) área do halo de inibição em aumento 40X; b, d) a mesma área em 100X.

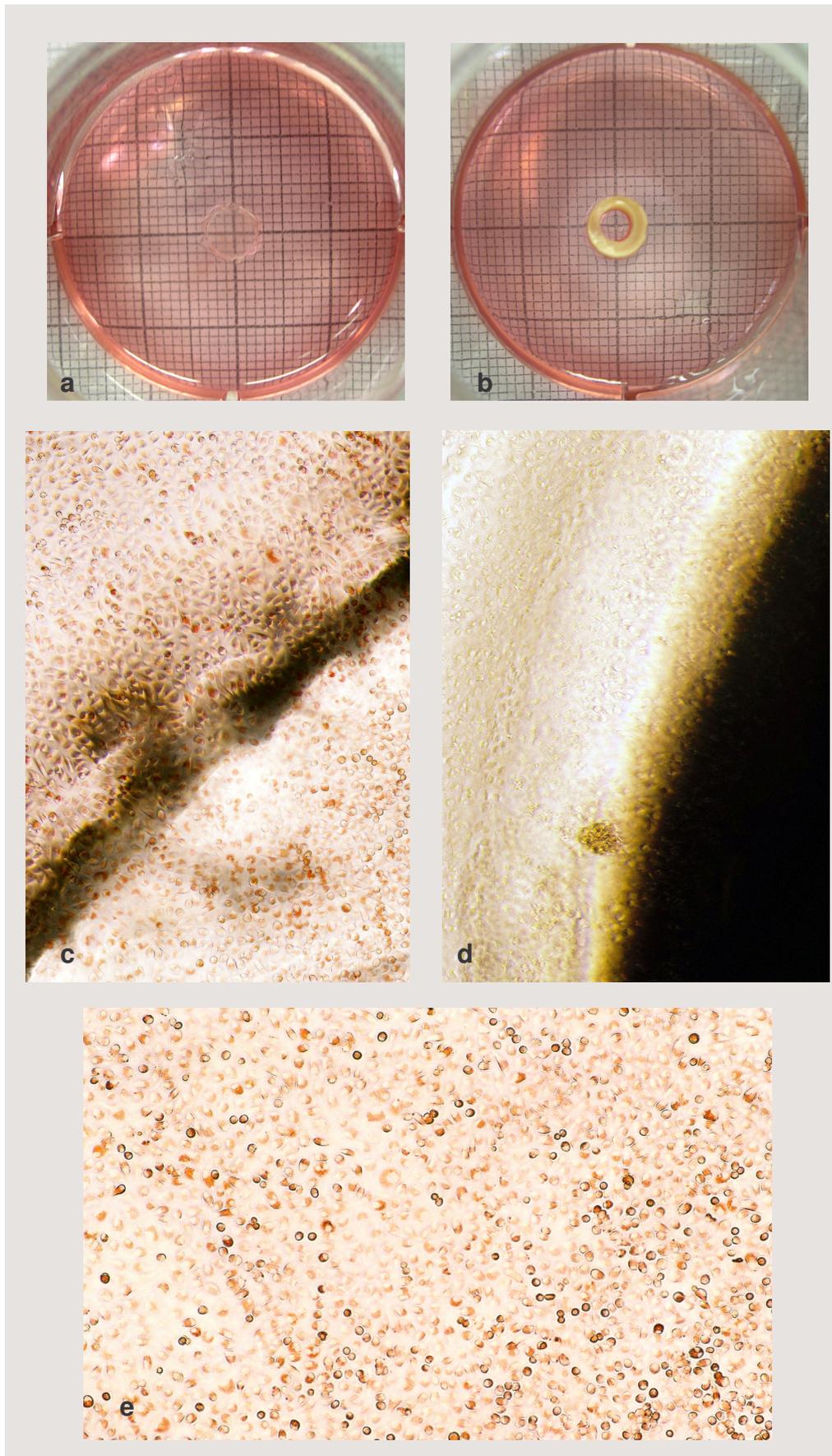


Figura 16. a) controle (-) teflon; b) controle (+) látex; c) controle (-) 100X; d) controle (+) 100X; e) controle celular 100X.

5.2 Análise da morfologia celular

O controle celular foi o padrão morfológico de viabilidade. As células viáveis encontravam-se aderidas, com integridade de membrana e homogeneidade de citoplasma, permanecendo coradas em vermelho (Figura 17). A perda da adesão celular pressupõe alterações morfológicas ainda que o corante estivesse presente, sugerindo que as funções celulares não estariam dentro da normalidade. Esta área de baixa densidade celular não resultou, necessariamente, em zona descorada.

O ProRoot™ MTA permitiu, em áreas de dois poços, que células viáveis estivessem ao seu redor. Para a observação da zona sob o material, foi feita a sua remoção do agar, revelando células lisadas (Figura 18).

A área fotografada do poço 2 do MTA Branco Angelus® possibilitou a observação dos 4 momentos diferentes da morfologia celular que ocorreram nos halos: lise celular; arredondamento das células com desprendimento do substrato; alteração de forma; e células viáveis, com citoplasmas homogêneos, em monocamada (Figura 19).

O MBPc revelou a maior zona de lise celular e de células morfológicamente alteradas dentre os 3 cimentos. Assim, somente foi possível a visualização destas zonas com a amostra e células viáveis em um só campo, microscopicamente, no quadrante 1 do poço 3 (40X), onde ocorreu a menor extensão do halo (Figura 20a). Ainda assim, somente aparece parte dele, em 100X de aumento (Figura 20b). Em 200X, foram vistas, claramente, a ausência de adesão e a morfologia celular da área de inibição, com células arredondadas e núcleos ainda presentes (Figura 20c). Em 400X é possível ver a vacuolização do citoplasma (Figura 20d).

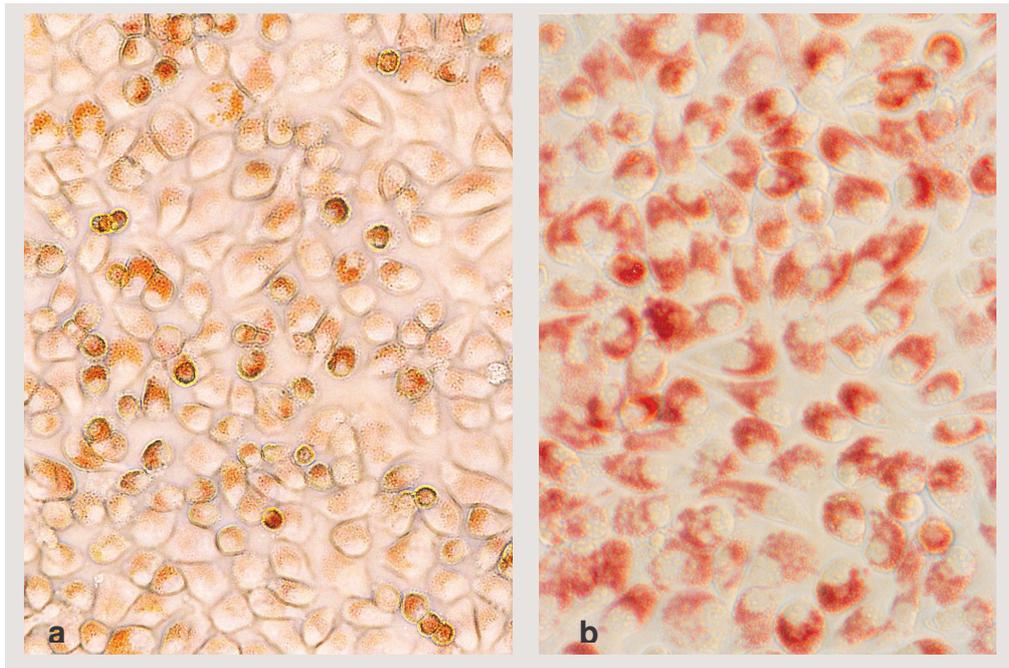


Figura 17. Controle celular para a observação da morfologia: a) 200X; b) 400X.

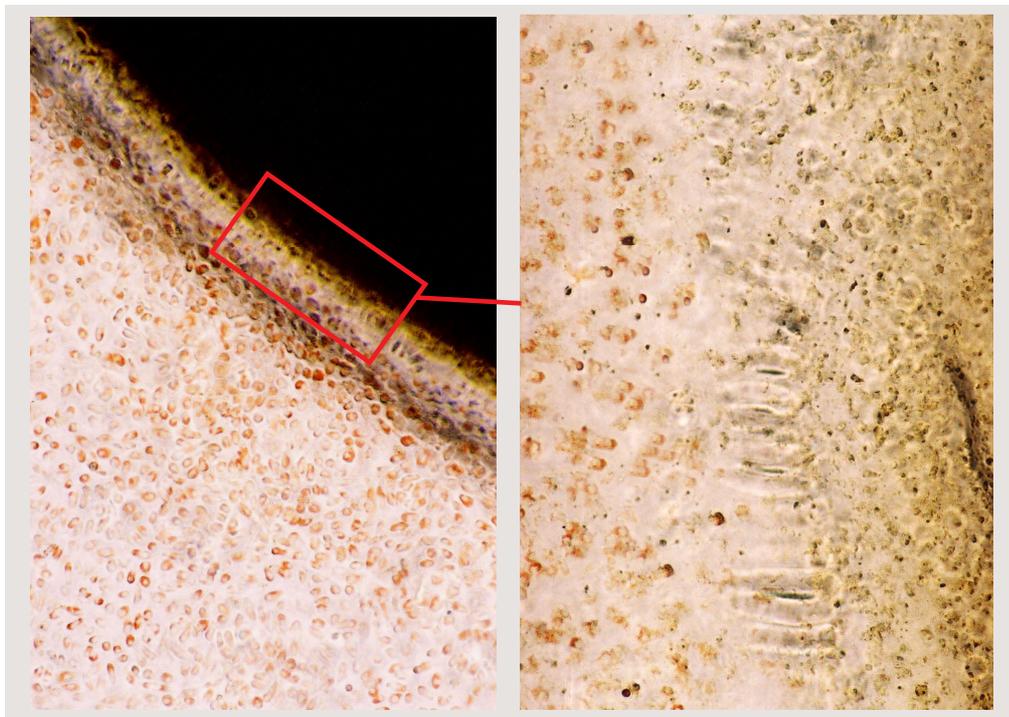


Figura 18. Poço 3 do ProRoot™, destacando a área com células viáveis junto ao cimento e lise sob ele, após a sua remoção (100x).

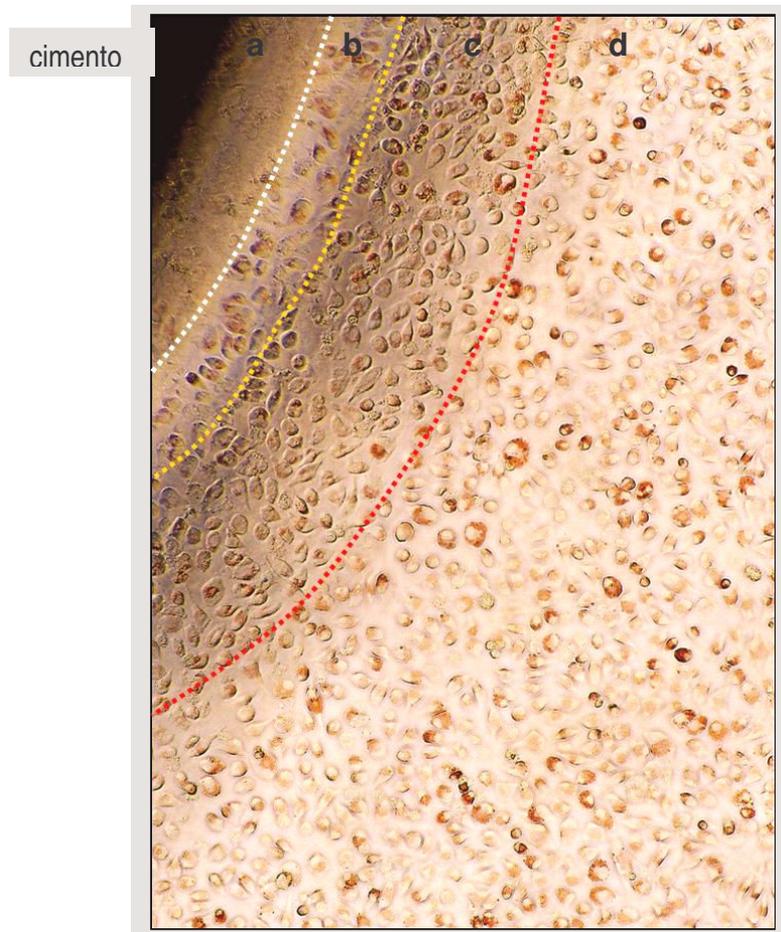


Figura 19. Poço 2 do MTA Branco Angelus® 100X: a) lise celular; b) arredondamento das células com desprendimento do substrato; c) alteração de forma; d) células viáveis, em monocamada.

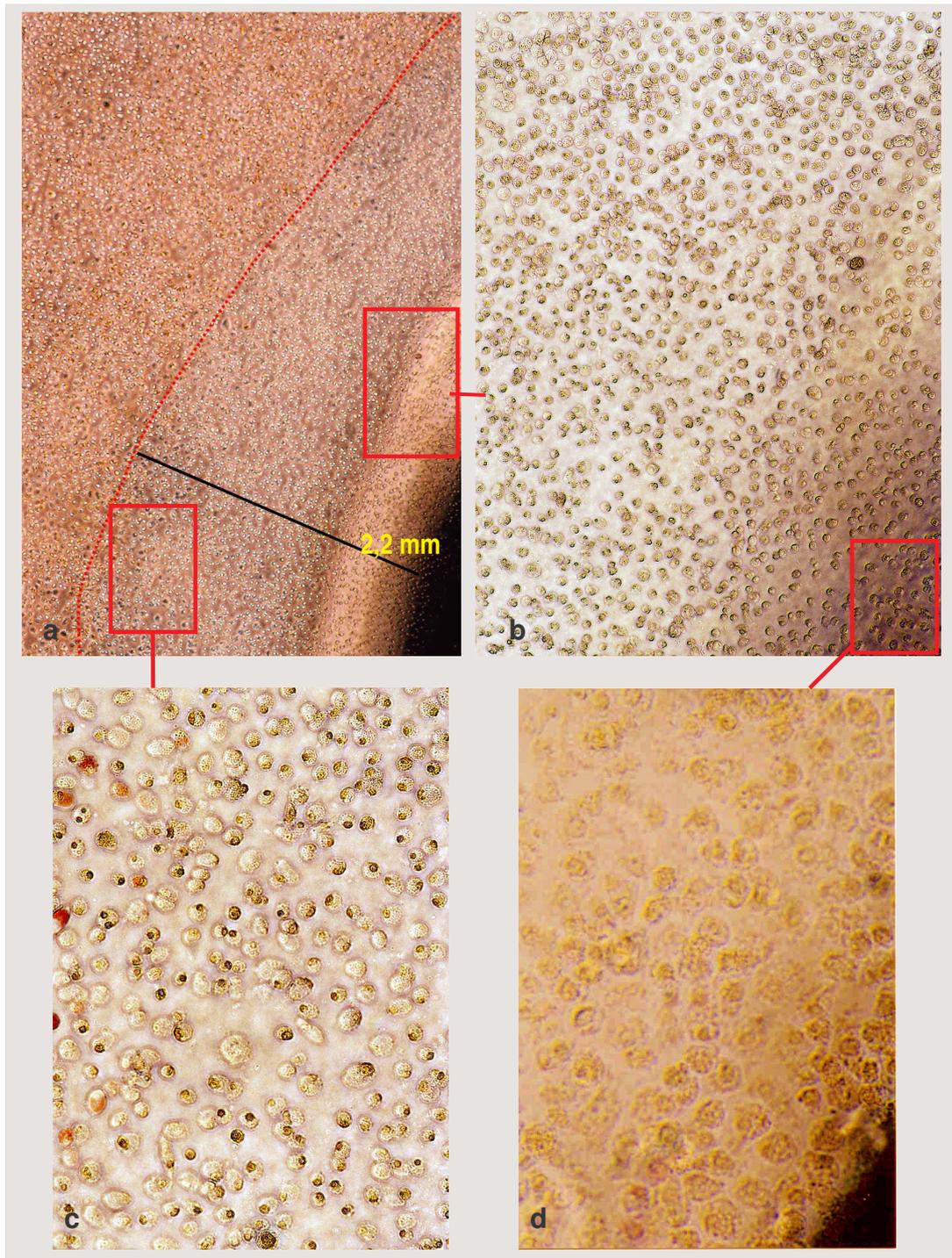


Figura 20. Poço 3 do MBPc: a) menor extensão do halo (40X); b) destaque em 100X; c) destaque em 200X; d) destaque em 400X.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Da linhagem celular

Experimentos com linhagens de células estabelecidas de mamíferos facilitam a reprodutibilidade dos resultados, além destas se multiplicarem rapidamente, com vida útil ilimitada (KOH et al., 1998).

Este trabalho foi realizado com fibroblastos de rato da linhagem permanente L929. Esta linhagem é recomendada pela ISO 10993-5 e é das mais comumente utilizadas em estudos de biocompatibilidade (WENDT; ZIEMIECKI; SPÄNGBERG, 1993; TORABINEJAD et al., 1995b; OSORIO et al., 1998; COHEN et al., 2000; SAIDON et al., 2003; HAGLUNG et al., 2003; KOULAZIDOU et al., 2005; CARVALHO, 2005; ANVISA, 2006). Além disso, os fibroblastos são células envolvidas no processo de reparo, por estarem presentes no LPD, onde ocorrerá o contato com os materiais reparadores de perfuração radicular.

A revisão da literatura relacionou, também, trabalhos *in vitro* relevantes em culturas celulares primárias, obtidas diretamente de tecidos vivos (BRISEÑO; WILLERSHAUSEN, 1991; MAKKAWY et al., 1998; KEISER; JOHNSON; TIPTON, 2000; ROGERO et al., 2003; PISTORIUS; WILLERSHAUSEN; MARROQUIN, 2003; NAKAYAMA et al., 2005; AL-RABEAH; PERINPANAYAGAM; MACFARLAND, 2006). Mesmo assim, é necessário o subcultivo em algumas passagens para observação da capacidade de reprodução e viabilidade celular, antes da utilização no ensaio.

6.2 Da metodologia

Considerando a discussão mundial, cada vez mais enfática, sobre a ética na utilização de animais de laboratório para os testes de substâncias (BABICH; BORENFREUND, 1990; ROBERFROID; GOETHALS, 1990; ANVISA, 2006), os testes *in vitro* deveriam sempre preceder os testes *in vivo* (OSORIO et al., 1998; FRESHNEY, 2000; ROGERO et al., 2003; HAUMAN; LOVE, 2003b; PRESGRAVE; PRESGRAVE, 2004; EMALT, 2005).

A cultura de células representa o estágio inicial de investigação de um material dentário. Os métodos são reprodutíveis, sensíveis, de baixo custo e minimizam as variáveis. Apesar disto, é importante ressaltar que os resultados obtidos podem não ser exatamente os mesmos da clínica, já que não é levada em conta a dinâmica tecidual (BRISEÑO; WILLERSHAUSEN, 1991; TORABINEJAD et al., 1995b; OSORIO et al., 1998; MAKKAWY et al., 1998; FRESHNEY, 2000; AZAR et al., 2000; ROGERO et al., 2003; QUEIROZ et al., 2005). Ainda assim, é seguro afirmar que um material que demonstre alta toxicidade celular, muito provavelmente será tóxico aos tecidos vivos (OSORIO et al., 1998).

Para a visualização das células vivas ao microscópio óptico, é necessário o tratamento prévio com corantes vitais (LINHARES; GEWANDSZNAJDER, 2003). O corante vermelho neutro é um corante vital solúvel em água, que passa pela membrana celular e se concentra nos lisossomos. Este trabalho utilizou o corante vermelho neutro no ensaio de difusão em agar (TORABINEJAD et al., 1995b; CRUZ et al., 1998; COHEN et al., 2000; ROGERO et al., 2003; CARVALHO, 2005). Segundo Cruz et al. (1998), este método apresenta ótima sensibilidade e, talvez,

seja o mais recomendado, já que não é necessário que o produto analisado sofra qualquer processamento.

Para que os resultados sejam válidos, devem ser tomados cuidados no sentido da preservação das células até o final do ensaio. Com este método, os cimentos ficam sobre a camada de agar, protegendo a cultura do dano físico (AZAR et al., 2000; COHEN et al., 2000). Por outro lado, os resultados advindos desta metodologia dependem da taxa de difusão das substâncias presentes nos materiais, de seus pesos moleculares e de sua solubilidade em água (TORABINEJAD et al., 1995b).

Este teste de citotoxicidade avalia a viabilidade celular, em resposta imediata ou em curto prazo (FRESHNEY, 2000), por isso o período de exposição da cultura aos cimentos, no presente estudo, foi de 24 h.

Ainda com o objetivo de evitar o contato direto, através de outro método de difusão, Safavi et al. (1989) desenvolveram um dispositivo de base porosa para levar o material a ser testado aos poços. Neste caso, as substâncias solúveis alcançam as células permeando o meio líquido (WENDT; ZIEMIECKI; SPÄNGBERG, 1993; SAIDON et al., 2003; HAGLUNG et al., 2003; KOULAOUZIDOU et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2005).

6.3 Dos cimentos testados

A escolha do material reparador é um importante fator no prognóstico do dente que sofreu perfuração radicular. A capacidade seladora é, em geral, a primeira propriedade testada. Inúmeros trabalhos a esse respeito com o cimento MTA e os

que estão se desenvolvendo com o MBPc demonstram excelentes resultados. A combinação desta com a biocompatibilidade é fundamental.

6.3.1 MTA

Desde sua apresentação, em 1993, no estudo de Lee, Monsef e Torabinejad, como material reparador de perfurações radiculares, o MTA vem sendo considerado o material de eleição para o vedamento das perfurações por suas excelentes qualidades de selamento, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e estímulo à regeneração tecidual (MAIN et al., 2004).

Os resultados da pesquisa de Torabinejad et al. (1995a) mostraram os íons Ca e P como as principais moléculas presentes no MTA e pH de aproximadamente 12. Porém, Herzog-Flores et al. (2000), Sarkar et al. (2005), Nakayama et al. (2005) e Asgary et al. (2005) não encontraram P em sua composição, mas afirmaram que o principal íon dissociado é o Ca, proveniente do óxido de cálcio. Ao entrar em contato com os fluidos tissulares, este se converte em Ca(OH)_2 (DUARTE et al., 2003; CAMILLERI et al., 2004). Assim, além do alto pH, o estímulo à formação de barreira calcificada pelo MTA tem sido equiparada à do Ca(OH)_2 .

A maioria das pesquisas foi comparativa com outros materiais comumente utilizados em capeamento pulpar, selamento de perfuração, obturação apical ou apicificação, indicações clínicas de Torabinejad e Chivian (1999) para o uso do MTA. Todos os resultados foram superiores para este material. Em estudos *in vivo*, Shabahang et al. (1999) e Holland et al. (2001) demonstraram formação de tecido duro significativamente maior com o MTA do que com o Ca(OH)_2 , e Ford et al. (1995) em relação ao amálgama, no selamento de perfurações radiculares em

dentos de cães. Torabinejad et al. (1997), examinando a resposta do tecido perirradicular de macacos ao MTA, constataram que, após 5 meses, havia uma camada espessa de cimento sobre o material e, até mesmo, fibras de LPD inseridas nas linhas incrementais.

Com o objetivo de pesquisar o mecanismo pelo qual este material estimula a cementogênese, Koh et al. (1998), Thomson et al. (2003) e Nakayama et al. (2005) estudaram a relação do MTA com a liberação de citocinas pelas células, já que estas glicoproteínas estão envolvidas no metabolismo de formação óssea. Observaram que os níveis das citocinas aumentaram na presença do MTA. Por outro lado, Haglung et al. (2003) não confirmaram estes achados. Economides et al. (2003) relataram que, inicialmente, o efeito estimulador do MTA ocorre sobre os fibroblastos e que a formação de tecido duro parece ser ativada progressivamente, embora este mecanismo seja, ainda, desconhecido.

Quando o MTA foi submetido ao ambiente biológico ocorreu formação de HA (HERZOG-FLORES et al., 2000; SARKAR et al., 2005). Bozeman et al. (2004) observaram cristais de HA na superfície do MTA cinza e do branco, quando suspensos em solução salina fosfatada (PBS), sendo maior sobre o cinza.

A diferença de coloração entre os dois tipos de MTA é devida à redução drástica do íon ferro no MTA branco (ASGARY et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005). Este fato somado à aspereza de sua superfície podem ser responsáveis pelos achados de Pérez et al. (2003) e Camilleri et al. (2004), que revelaram menor número de células sobre o MTA branco comparado ao cinza. Mesmo assim, ambos são biocompatíveis, de acordo com estes e outros trabalhos *in vivo* e *in vitro* (HOLLAND et al., 1999; HOLLAND et al., 2002; FARACO Jr.; HOLLAND, 2004; HERNANDEZ et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; AL-RABEAH; PERINPANAYAGAM;

MACFARLAND, 2006). Recentemente, Shahi et al. (2006) encontraram resultados opostos, onde a resposta inflamatória tecidual ao MTA cinza foi mais severa que ao branco, na primeira semana.

O tempo de endurecimento do MTA cinza foi apresentado por Lee, Monsef e Torabinejad (1993) como de, aproximadamente, 4h. Estudos posteriores postularam 2 h e 45 min (TORABINEJAD et al., 1995a, b). No presente estudo, o ProRoot™ MTA cinza endureceu em 30 min, acorde Herzog-Flores et al. (2000), e o MTA Branco Angelus®, em 15 min, conforme afirma o fabricante.

A ciência, em sua dinâmica, está sempre na busca do aprimoramento. Assim, ainda que o MTA apresente excelentes propriedades, pesquisas no sentido de melhorá-las são realizadas. Rallis et al., em 2004, substituíram a água destilada pelo lubrificante KY®, para melhorar a consistência da mistura e verificaram que sua biocompatibilidade não se alterou. O contrário, entretanto, ocorreu quando Hernandez et al. (2005) testaram a associação do MTA branco com clorexidine 0,12%, no intuito de aumentar seu potencial antimicrobiano.

Diante dos resultados favoráveis nos diversos testes a que este material vem sendo submetido, desde a década passada, sua ampla utilização vem confirmando a sua biocompatibilidade no acompanhamento clínico e radiográfico dos casos tratados (MAIN et al., 2004; MENEZES et al. 2005; MIRANDA; MIRANDA, 2005; BRAMANTE et al., 2006).

6.3.2 MBPc

A composição do MBPc une Ca(OH)_2 e resina epóxica, pretendendo reproduzir, como efeito de sua aplicação, as boas propriedades de ambas substâncias. O material, neste estudo, endureceu em 1 h e 50 min.

O Ca(OH)_2 possui alto pH (12,6) e suas propriedades anti-bacteriana e mineralizadora vêm de sua dissociação em íons Ca e hidroxila (ESTRELA et al., 1995; BUSATO; COSTA; ESTRELA, 1997). Para que exerçam sua ação, é necessário que estes íons sejam liberados, mesmo após o endurecimento do cimento (LOPES; SIQUEIRA Jr., 2004). Siqueira Jr. et al. (1995 apud LOPES e SIQUEIRA Jr., 2004) identificaram este efeito com o cimento Sealer 26®, onde a resina epóxica não impediu a difusão do medicamento.

Cimentos à base de Ca(OH)_2 foram os menos citotóxicos nas pesquisas de Osorio et al. (1998), Huang et al. (2002) e Schwarze et al. (2002). A citotoxicidade inicial pode se dever ao alto pH, causando morte celular por necrose, porém, depois de endurecido, esta é significativamente reduzida (WILLERSHAUSEN et al., 2000; HUANG et al., 2004). Contudo, Queiroz et al. (2005) encontraram maior agressão celular com o cimento Sealer 26®, apesar de possuir Ca(OH)_2 , do que com o Top Seal®, somente resinoso (resina epóxica).

Os cimentos à base de resina epóxica foram introduzidos na prática endodôntica devido a características favoráveis de adesão à estrutura dental, bom tempo de trabalho e boa capacidade seladora (AZAR et al., 2000; SILVA NETO; MORAES, 2003; SILVA NETO et al., 2005). A maior divergência é quanto à toxicidade destes materiais. Briseño e Willershausen (1991) afirmaram que o alto potencial citotóxico do AH26® se estendeu por 21 dias, e que não houve redução

proporcional ao tempo de endurecimento, discordando de Lopes e Siqueira Jr. (2004), que observaram que os cimentos perdem esta condição após o endurecimento. Por outro lado, Azar et al. (2000) demonstraram o efeito citotóxico do AH Plus® somente até 4 h. Schwarze et al. (2002) notaram inibição moderada até 1 h, enquanto Bouillaguet et al. (2006) relataram este grau em 24 h e aumentado em 72 h. Cohen et al. (2000) encontraram reatividade biológica severa para o AH26 e para o AH Plus, e discutiram que o AH Plus libera pouquíssima quantidade de formaldeído e, assim, sua toxicidade deve estar relacionada à resina epóxica. Isto foi confirmado por Huang et al. (2004), quando testaram as duas pastas do AHPlus® separadamente e confirmaram a maior toxicidade da pasta A, que contém a resina epóxica. Huang e Chang (2005) evidenciaram que além de serem citotóxicos, estes cimentos estimulam a COX-2, ativando o processo inflamatório.

Em estudo *in vivo*, Cintra (2006) revelou que o MBPc promoveu reação tecidual de cura um pouco mais lenta que o MTA, provavelmente pela interação com o componente resinoso, mas ao final de 30 dias, formação óssea foi vista, até em contato direto com o cimento.

6.4 Dos resultados

A citotoxicidade dos materiais foi revelada através da presença de um halo claro ao redor das amostras, que foram medidos através de grade milimétrica (TORABINEJAD et al., 1995b; CRUZ et al., 1998; ROGERO et al., 2003).

Os cimentos ProRoot™ MTA e MTA Branco Angelus® receberam o grau 1, pois não foram observadas áreas descoradas ao redor das amostras, apenas sob elas ($p > 0,05$).

Da mesma forma, através da difusão em agar, Torabinejad et al. (1995b) registraram zona de lise ao redor das amostras de MTA cinza, após 24 h, sem diferença entre o cimento recém-preparado e o endurecido. Utilizando difusão através do meio, Saidon et al. (2003) e Haglung et al. (2003) encontraram proteínas desnaturadas e células mortas abaixo das amostras, lise e alteração morfológica ao redor delas e células normais na maior área do poço para o referido material recém-manipulado. Estes achados morfológicos também se revelaram neste estudo, embora tenham sido aqui utilizados os cimentos endurecidos por 48h, concordando com Koulaouzidou et al. (2005), que em experimento semelhante àqueles, com o MTA cinza endurecido por 48 h, observaram pequena citotoxicidade. Outros autores mostraram, através de diferentes metodologias e linhagens celulares, a baixa citotoxicidade deste material (KEISER; JOHNSON; TIPTON, 2000; PISTORIUS; WILLERSHAUSEN; MARROQUIN, 2003; BALTO, 2004; NAKAYAMA et al., 2005), corroborando com os resultados deste ensaio.

Apesar de os dois tipos de MTA demonstrarem efeitos bastante similares sobre as células, durante a análise microscópica foi interessante notar que o comportamento celular frente ao ProRoot™ MTA foi mais favorável do que ao MTA Branco Angelus®. Com este último, áreas de menor densidade celular puderam ser vistas, mesmo que houvesse células viáveis. Pérez et al. (2003) e Camilleri et al. (2004) revelaram menor crescimento celular na presença do MTA branco, mas confirmaram a sua biocompatibilidade.

O presente estudo revelou o grau de citotoxicidade 2 (branda) para o cimento MBPc, testado ao final de 48 h de endurecido, enquanto alguns autores (OSORIO et al., 1998; COHEN et al., 2000; TAI; HUANG; CHANG, 2001; HUANG et al., 2002) demonstraram severa citotoxicidade para os cimentos resinosos neste período. Os

achados morfológicos revelaram células alteradas e lisadas em maior área do que nos outros cimentos testados. Entretanto, o aspecto celular na maior parte dessa região era de arredondamento, com ausência do corante e presença de núcleos, provavelmente em processo de apoptose. Próximo aos cimentos, as células estavam com citoplasmas vacuolados ou lisadas, diferentemente do controle positivo, onde em todo o halo as células estavam lisadas ($p < 0,05$).

Os halos foram facilmente identificados nos poços do MBPc e nos controles positivos, ao contrário dos poços que continham as amostras dos dois tipos de MTA ($p < 0,05$). A observação microscópica evidenciou que, ainda assim, em alguns poços destas amostras houve área de lise e alterações da morfologia celular, junto aos cimentos. Assim, dentro do grau leve, puderam-se notar diferenças. Para ultrapassar esta limitação visual, as fotografias dos poços foram submetidas à medição digital, mas não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Estas medidas macroscópicas foram comparadas com as microscópicas e, embora estas últimas fossem apenas de uma região de cada poço, favoreceram a visualização do que realmente ocorria na monocamada celular. A conversão destes valores de pixel para milímetro está de acordo com o trabalho de Souza et al. (2002). Para uma evidenciação precisa destas diferenças, um estudo bioquímico seria adequado, permitindo uma análise quantitativa das células viáveis, após a exposição a estes materiais.

De acordo com o POP/FIOCRUZ e Cohen et al. (2000), todas as amostras testadas foram consideradas satisfatórias, pois nenhuma cultura exposta a elas mostrou toxicidade superior ao grau 2 (branda). Pode-se dizer que o cimento experimental MBPc tem potencial citotóxico baixo, porém, outros estudos *in vitro*, *in*

vivo e em seres humanos são necessários para a confirmação de sua biocompatibilidade e sua indicação clínica nas mesmas condições do MTA.

O efeito citotóxico dos materiais reparadores de perfuração radicular testados neste estudo pode diferir de outros relatados na literatura, devido à variedade de métodos e culturas celulares utilizados. Discrepâncias, portanto, podem estar relacionadas às condições experimentais.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- os cimentos reparadores empregados nas perfurações radiculares ProRoot™ MTA cinza e MTA Branco Angelus® foram levemente citotóxicos, sem diferença estatística significativa entre eles; o cimento experimental MBPc foi o mais citotóxico, contudo a amostra foi considerada satisfatória, devendo-se considerar a realização de outros testes de biocompatibilidade;
- as alterações morfológicas celulares promovidas pelos 3 cimentos ocorreram na seguinte ordem crescente de intensidade: ProRoot™ MTA cinza, MTA Branco Angelus® e MBPc, considerando que todas foram significativamente menos intensas do que as provocadas pelos controles positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHADAINY, H. A. Root perforations. A review of literature. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol**, v. 78, n. 3, p. 368-74, Sept. 1994.

AL-RABEAH, E.; PERINPANAYAGAM, H.; MACFARLAND, D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. **J Endod**, v. 32, n. 9, p. 872-5, Sept. 2006.

ANVISA - Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos- Metodologias – Ensaio *in vitro*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/pag05.htm#512>>. Acesso em: 26/06/2006.

ASGARY, S. et al. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 31, n. 2, p. 101-103, Feb. 2005.

AZAR, N. G. et al. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **J Endod**, v. 26, n. 8, p. 462-5, Aug. 2000.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. **ATLA**, v.18, p. 129-44, Nov. 1990. Disponível em: <<http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/atla/18/atla18o.htm>>. Acesso em: 20/08/2006.

BALTO, H. A. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. **J Endod**, v. 30, n.1, p. 25-9, Jan. 2004.

BOUILLAGUET, S. et al. Initial *in vitro* biological response to contemporary endodontic sealers. **J Endod**, v. 32, n. 10, p. 989-92, Oct. 2006.

BOZEMAN, T. B. et al. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **The IADR/AADR/CADR 82nd General Session [online]**. Mar. 2004 Hawaii Convention Center. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2004Hawaii/techprogram/abstract_47379.htm>. Acesso em: 10/10/2005.

BRAMANTE, C. M. et al. Tratamiento de una perforación radicular con trióxido mineral agregado CPM. **Rev Asoc Odontol Argent**, v. 94, n. 1, p. 23-6, ene-mar. 2006.

BRISEÑO, B. M.; WILLERSHAUSEN, B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. Silicone and resin-based sealers. **J Endod**, v. 17, n. 11, p. 537-40, 1991.

BUSATO, A. L. S.; COSTA, C. A. S.; ESTRELA, C. Dental Restorative material biocompatibility. **Braz Endod J**, v. 2, n. 2, 1997.

CAMILLERI, J. et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. **Int Endod J**, v. 37, p. 699-704, 2004.

CARVALHO, M. A. A. **Citotoxicidade de três cimentos obturadores do sistema de canais radiculares sobre cultura de células L929**. 2005. 86p. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

CINTRA, L. T. A. et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPc: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. **J Endod**, v. 32, n. 6, p. 556 - 9, Jun. 2006.

COHEN, B. I. et al. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. **J Endod**, v. 26, n. 4, p. 228-9, Apr. 2000.

CRUZ, A. S. et al. Comparison of methods to test an "in vitro" test of cytotoxicity of biocompatible hospital materials. **Rev Saúde Pública**, v. 32, n.2, p.153-9, Apr. 1998.

DUARTE, M. A. H. et al. Ph and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 95, p. 345-7, 2003.

ECONOMIDES, N. A. et al. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 44-8, 2003.

EMALT: a Brazilian meeting on alternatives methods to animal use for regulatory purposes. **ATLA**, v. 33, Dec. 2005. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/atla/33_6/ConfReport%2033.6.pdf>. Acesso em: 07/09/2006.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, v. 6, p. 85-90, 1995.

FARACO JÚNIOR, I. M.; HOLLAND, R. Histomorphological response of dogs`dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. **Braz Dent J**, v. 15, n. 2, p. 104-8, Feb. 2004.

FORD, T. R. et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 79, p. 756-63, Jun. 1995.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

HAGLUNG, R. et al. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 6, p. 739-45, Jun. 2003.

HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **Int Endod J**, v. 36, n. 3, p. 75-85, Mar. 2003a.

HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. **Int Endod J**, v. 36, n. 3, p. 147-60, Mar. 2003b.

HERNANDEZ, E. P. et al. Effect of ProRoot® MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. **Int Endod J**, v. 38, p. 137-43, 2005.

HERZOG-FLORES, D. S. et al. Análisis fisicoquímico del mineral trióxido agregado (MTA) por difracción de rayos X calorimetría y microscopia electrónica de barrido. **Revista ADM**, v. LVII, n. 4, p. 125-31, Jul-Ago. 2000.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J Endod**, v. 25, n. 3, p. 161-66, 1999.

HOLLAND, R. et al. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. **J Endod**, v. 27, n. 4, p. 281-4, Apr. 2001.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. **Braz Dent J**, v. 13, n. 1, p. 23-6, 2002.

HUANG, F. M. et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide- based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. **Int Endod J**, v. 35, p. 153-8, 2002.

HUANG, F. M ; CHANG, Y. C. Prevention of epoxy resin-based root canal sealers-induced cyclooxygenase-2 expression and cytotoxicity of human osteoblasts cells by various antioxidants. **Biomaterials**, v. 26, p. 1849-55, 2005.

HUANG, T. H. et al. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. **J Mater Sci Mater Med**, v. 15, p. 767-71, 2004.

INGLE, J. I.; BEVERIDGE, E. E. **Endodontia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1979. 40-2p.

INTERNATIONAL Organization for Standardization. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Estocolmo, 1996.

KEISER, K.; JOHNSON, C. C.; TIPTON, D. A. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. **J Endod**, v. 26, n. 5, p. 288-91, 2000.

KOH, E. T. et al. Cellular response to mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 24, n. 8, p. 543-7, Aug. 1998.

KOULAOUZIDOU, E. A. et al. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. **J Endod**, v. 31, n. 1, p. 44-6, Jan. 2005.

LEE, S. J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J Endod**, v. 19, n. 11, p. 541-4, Nov. 1993.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F. **Biologia Hoje - volume1**. 14 ed. São Paulo: Ed. Ática, 2003.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Biologia e Técnica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004. 626-40 p.

MAIN, C. et al. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. **J. Endod**, v. 30, n. 2, p. 80-3, Feb. 2004.

MAKKAWY, H. A. et al. Cytotoxicity of root perforation repair materials. **J Endod**, v. 24, n. 7, p. 477-9, Jul. 1998.

MENEZES, R. et al. MTA repair of a supracrestal perforation: a case report. **J Endod**, v. 31, n. 3, p. 212-4, Mar. 2005.

MIRANDA, R. B.; MIRANDA, M. B. Tratamento de perfuração radicular – Relato de um caso clínico. **JBE**, v. 5, n. 21/22, p. 422-5, jul-dez. 2005.

NAKAYAMA, A. et al. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. **Int Endod J**, v. 38, p. 203-10, 2005.

OSORIO, R. M. et al. Cytotoxicity of endodontic materials. **J Endod**, v. 24, n. 2, p. 91-6, Feb. 1998.

PÉREZ, A. L. et al. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot™ MTA and white MTA. **Int Endod J**, v. 36, n. 9, p. 564-70, 2003.

PISTORIUS, A.; WILLERSHAUSEN, B.; MARROQUIN, B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblast. **Int Endod J**, v. 36, n. 9, p. 610-15, 2003.

PRESGRAVE, R. F.; PRESGRAVE, O. A. F. Novo teste para detectar irritação ocular dispensa uso de animais de laboratório. INCQS/FIOCRUZ. Entrevista concedida a Sarita Coelho em fev. 2004. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/arquivosite/novidades/fev04/olho_sar.htm>. Acesso em: 07/06/2006.

PROCEDIMENTO Operacional Padronizado/ Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ. (65.3330.010). Ensaio de citotoxicidade in vitro – método de difusão em agar. 17 p.

QUEIROZ, C. E. S. et al. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos Topseal e Sealer 26 em culturas de macrófagos - Avaliação da produção de óxido nítrico. **JBE**, v. 5, n. 20, p. 390-5, 2005.

RALLIS, D. J. et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed water-based lubricant. **The IADR/AADR/CADR 82nd General Session [online]**. Mar. 2004 Hawaii Convention Center. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2004Hawaii/techprogram/abstract_42626.htm>. Acesso em 10/10/2005.

RAPPAPORT, H. M.; LILLY, G. E.; KAPSIMALIS, A. W. Toxicity of endodontics filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 18, n. 6, p. 785-801, Dec. 1964.

RIBEIRO, A. R. et al. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white portland cements. **J Endod**, v. 31, n. 8, p. 605-7, Ago. 2005.

ROBERFROID, M. R.; GOETHALS, F. *In vitro* toxicology: a challenge for the 21st century. **ATLA**, v. 18, p. 19-22, Nov. 1990. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/atla/18/atla18c.htm>. Acesso em: 20/08/2006.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-20, 2003.

SAIDON, J. et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 4, p. 483-9, Apr. 2003.

SARKAR, N. K. et al. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v. 31, n. 2, p. 97-100, Feb. 2005.

SAFAVI, K. E. et al. An *in vitro* method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. **J Endod**, v. 15, n. 10, p. 484-6, Oct. 1989.

SCHWARZE, T. et al. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **J Endod**, v. 28, n. 11, p. 784-6, Nov. 2002.

SHABAHANG, S. et al. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. **J Endod**, v. 25, n. 1, p. 1-5, Jan. 1999.

SHAHI, S. et al. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J Endod**, v. 32, n. 8, p. 776-80, Aug. 2006.

SILVA NETO, U. X.; MORAES, I. G. Capacidade seladora proporcionada por alguns materiais quando utilizados em perfurações na região de furca de molares humanos extraídos. **J Appl Oral Sci**, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2003.

SILVA NETO, U. X. et al. Avaliação, *in vitro*, da capacidade de selamento de obturações retrógradas realizadas com agregado de trióxido mineral e um cimento experimental. **JBE**, v. 5, n. 20, p. 361-5, 2005.

SOUZA, I. K. F. et al. Estudo histológico e computadorizado das áreas com células parietais e principais no estômago de ratos Wistar tratados com pantoprazol e "N-Nitroso-N-Methylurea" (NMU). **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 4, p. 251-7, 2002.

TAI, K. W.; HUANG, F. M.; CHANG, Y. K. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. **J Endod**, v. 27, n. 9, p. 571-3, Sep.2001.

THOMSON, T. S. et al. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 29, n. 6, p. 407-12, Jun. 2003.

TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v. 21, n. 7, p. 349-53, 1995a.

TORABINEJAD, M. et al. Cytotoxicity of four root end filling materials. **J Endod**, v. 21, n. 10, p. 489-92, 1995b.

TORABINEJAD, M. et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root end filling in monkey. **J Endod**, v. 23, n. 4, p. 225-28, 1997.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 25, n. 3, p. 197-205, Mar.1999.

WENDT, S. L.; ZIEMIECKI, T. L.; SPÄNGBERG, L. S. Indirect cytotoxic evaluation of a dental materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 75, p. 353-6, 1993.

WILLERSHAUSEN, B. et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. **J Endod**, v.26, n. 12, p. 703-7, Dec. 2000.

ZHU, Q. et al. Adhesion of Human Osteoblasts on Root-End Filling Materials. **J Endod**, v. 26, n. 7, p. 404-6, July 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Procedimentos com células L929

1) Considerações gerais:

- efetuar todas as operações com células, preparação e transferência de meios e soluções, em fluxo laminar vertical, com material estéril;
- pipetar todas as soluções e suspensões contendo células com pipetador automático;
- aquecer os meios e soluções em banho-maria a 37°C, antes do uso com as células.

2) Descongelamento das células:

- remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;
- colocar o frasco em banho-maria a 37°C até o descongelamento da suspensão celular, com constante agitação;
- transferir o conteúdo do frasco, com pipeta Pasteur, para garrafa de cultura plástica de 25 cm², com 5 ml de MEM completo;
- homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;
- incubar em estufa umidificada, a 37°C com 5% CO₂;
- no caso do glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura 48h após o descongelamento, substituindo-o por 5 ml de MEM completo;
- realizar, pelo menos, 2 subcultivos após o descongelamento, antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

Fonte: PROCEDIMENTO Operacional Padronizado/ Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ. (65.3330.010). Ensaio de citotoxicidade in vitro – método de difusão em agar. 17 p.

ANEXO B – Meios utilizados nas culturas celulares

1) MEM 1X concentrado com sais de Earle – Sigma M 0268:

- Para cada 9,6 g de pó, equivalente a 1 litro de meio:

- a) 900 ml de água desionizada;
- b) 2,2 g de bicarbonato de sódio;
- c) ajustar pH do meio a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.

Nota: adicionar água desionizada para completar 1 litro.

2) MEM completo 1X concentrado:

- MEM 1X concentrado, suplementado com:

- a) soro fetal bovino 5% v/v
- b) sulfato de estreptomicina 100 µ/ ml
- c) penicilina G potássica 100 UI/ ml
- d) L-glutamina 2 mM

Nota: emprego como meio de manutenção de células.

3) MEM 2X concentrado:

- Para cada 19,2 g de pó:

- a) 1000 ml de água desionizada;
- b) solução de bicarbonato de sódio a 2,8% para ajustar o pH a 7,2.

Nota: adicionar soro fetal bovino 10% v/v para o emprego na composição do meio de cobertura das células.

4) Agar 1,8% com 0,01% de vermelho neutro:

- a) agar Bacto Difco 3,6 g
- b) vermelho neutro 0,02 g
- c) água desionizada 200 ml

5) Meio de cobertura:

- Para cada 100 ml:

- a) agar 1,8% com 0,01% de vermelho neutro 50 ml
- b) MEM 2X concentrado 50 ml

6) Meio de congelamento com glicerol:

- MEM 1X concentrado, suplementado com:

- a) soro fetal bovino 20% v/v
- b) glicerol 10% v/v
- c) sulfato de estreptomicina 100 µ/ ml
- d) penicilina G potássica 100 UI/ ml
- e) L-glutamina 2 mM

7) Solução salina tamponada com fosfato (PBS):

- a) cloreto de sódio (PM 58,44) 32 g
- b) cloreto de potássio (PM 74,55) 0,8 g
- c) fosfato de sódio dibásico (PM 141,96) 4,6 g
- d) fosfato potássio monobásico (PM 136,09) 0,8 g
- e) água desionizada 4,0 litros

Nota: ajustar pH do meio a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;

8) Meio Dulbecco's (DMEM)

- Modificação do MEM (Dulbecco e Freeman, 1959; Morton, 1970), com alta concentração dos nutrientes.