

**Universidade do Grande Rio
“Prof. José deSouza Herdy”**

ROSANGELA ACRIS PINHEIRO

**CITOTOXICIDADE DE TRÊS CIMENTOS DE USO ENDODÔNTICO
EM CÉLULAS L-929**

**Duque de Caxias
2007**

ROSANGELA ACRIS PINHEIRO

**CITOTOXICIDADE DE TRÊS CIMENTOS DE USO ENDODÔNTICO
EM CÉLULAS L-929**

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

Orientador: Prof^a Sandra Rivera Fidel

**Duque de Caxias
2007**

P654c Pinheiro, Rosangela Acris.
Citotoxicidade de três cimentos de uso endodôntico em células L
929 / Rosangela Acris Pinheiro ; orientadora : Sandra Rivera Fidel .-
Duque de Caxias, RJ, 2007.
101 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Grande Rio “Prof. Jo
sé de Souza Herdy”, Escola de Odontologia, 2007.
Bibliografia: f. 94-101

1.Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cimentos dentários – Toxicida-
dade. 4. Materiais restauradores de canal radicular – Toxicidade. I. Fi-
del, Sandra Rivera. II. Título.

CDD – 657

ROSANGÊLA ACRIS PINHEIRO

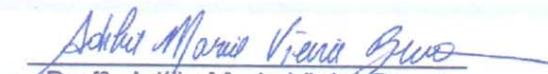
**CITOTOXICIDADE DE TRÊS CIMENTOS DE USO
ENDODÔNTICOS EM CÉLULAS L929**

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

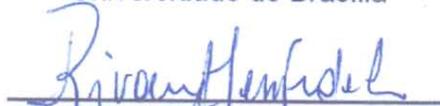
Aprovado em 19 de Abril de 2007

Banca Examinadora

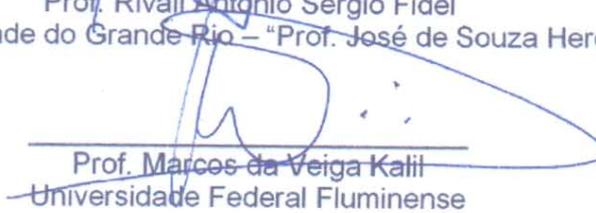
ODONTOLÓGICA



Prof^a. Adília Maria Vieira Bruno
Universidade de Brasília



Prof. Rivail Antonio Sérgio Fidel
Universidade do Grande Rio – "Prof. José de Souza Herdy"



Prof. Marcos da Veiga Kalil
Universidade Federal Fluminense

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha mãe Anna, iniciadora de toda essa jornada, gestora dos princípios que hoje fazem parte de minha vida e de minha família.

Ao meu esposo Celso pela sua presença constante nesses anos, que serviram de exemplo, incentivo, dedicação e de caminhada na rotina da vida pessoal e profissional nos momentos pródigos e conflitantes.

Aos meus filhos, Bianca e Leonardo, pedaço de nossas vidas, pela preocupação e incentivo nos momentos necessários no curso dessa nova etapa, e pelas suas contribuições de paz e harmonia em nosso espaço familiar, nesse momento tão importante.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A DEUS, senhor da sabedoria universal, por ter essa oportunidade concedida de extensão a novos conhecimentos adquiridos em meu aperfeiçoamento profissional.

Aos meus colegas do Curso de Mestrado, Alexandre, Jaqueline, Leandro e Ricardo e especialmente, Rosana e Katiana, pelo acréscimo de novos conhecimentos, que me foi dado com carinho, gentileza e amizade, na contribuição para a realização final desse trabalho.

Aos Professores Kalil e Marcos, no auxílio do início dessa jornada científica.

À Doutora Maria Aparecida Boller, exemplo de perseverança e profissionalismo, pelo convívio tão caloroso no desenvolvimento dessa pesquisa.

À equipe da Septodont, em especial a Dr^a Viviane.

À equipe da Fundação Oswaldo Cruz: Humberto, Wladimir e Michele que tanto contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Aos funcionários do Laboratório de Endodontia da Faculdade UERJ, em especial ao Marcelo e Ângelus.

Meu muito obrigado.

Agradecimento Especial

Ao Professor, Doutor Rivail Antonio Sergio Fidel e a Professora Doutora Sandra Rivera Fidel, por todo o apoio recebido durante este curso, por impulsionar meu desenvolvimento científico, pela valorização do meu trabalho, pela constante amizade.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Tapete Celular de fibroblastos de ratos.....	54
Figura 2. Linhagem L-929	55
Figura 3. Apresentação comercial do cimento Sealer 26 [®] (Dentsply)	58
Figura 4. Apresentação comercial do cimento Acroseal [®] (Septodont)	58
Figura 5. Apresentação comercial do cimento AH Plus [®] (Dentsply)	59
Figura 6. Padronização das Amostras	59
Figura 7. Controle Positivo e Controle Negativo	60
Figura 8. Ensaio de Citotoxicidade	63
Figura 9. Mensuração das áreas de necrose dos cimentos	69
Figura 10. Gráfico das medidas dos Quadrantes das Amostras	72
Figura 11. Gráfico das Médias dos Quadrantes das Amostras	72
Figura 12. Halos de Inibição do cimento AH Plus [®]	73
Figura 13. Linhagem L-929 com o cimento AH Plus [®]	74
Figura 14. Halos de Inibição do cimento Sealer 26 [®]	75
Figura 15. Linhagem L-929 com o cimento Sealer 26 [®]	76
Figura 16. Halos de inibição do cimento Acroseal [®]	77
Figura 17. Linhagem L-929 com o cimento Acroseal [®]	78
Figura 18. Controle Células e Controle Negativo	79
Figura 19. Controle Negativo.....	80

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1. Marca Comercial, composição química e fabricante dos cimento utilizados	57
Tabela 2. Grau de Citotoxicidade	68
Tabela 3. Valores dos Quadrantes por cultura de Células	69
Tabela 4. Percentual da Área de necrose Análise de Variância (ANOVA).....	70
Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA)	71
Tabela 6. Comparação entre as Médias (Student-Newman-Keuls)	71
Tabela 7. Avaliação Microscopica do cimento AH Plus®	73
Tabela 8. Avaliação Microscopica do cimento Sealer 26®	75
Tabela 9. Avaliação Microscopica do cimento Acroseal®	77

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA (American Dental Association)

FDI (Federation Dental International)

ISO (International Standard Organization)

RC-IAL (Linhagem de células fibroblásticas de rim de coelho)

HeLa (Linhagem de células epiteliais de carcinoma de colo de útero humano)

L-929 (Linhagem de fibroblastos de ratos)

MTT (Metiltetrazolium)

V79 (Linhagem de células primárias permanentes de Hamster)

3T3 (Cultura de fibroblastos de ratos)

DHL (Desidrogenase Láctica)

DMSO (Dimetilsulfóxido)

PGE₂ (Prostaglandinas E₂)

GSH (Glutathione)

DNA (Àcido desoxirribonucleico)

PDL (Células do Ligamento Periodontal Humano)

BPA (Bisfenol A)

NRU (Uptake Neutral Red)

ATCC (American Type Culture Colletion)

OD (Percentual de Sobrevivência Celular)

LPS (Lipopolissacarídeos)

OC₂ (Linhagem de células orais cancerígenas humana)

COX-2 (Cicloxigenase 2)

MEM (Meio essencial completo)

INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde)

USP (UNITED PHARMACOPEIA)

POP (Protocolo Operacional Padrão)

CC (Controle de células)

C- (Controle Negativo)

C+ (Controle Positivo)

VN (Vermelho neutro)

VERO (Células de rim de macaco)

NCTC2544 (Linhagem de células epiteliais)

BHK (Linhagem de células de rim de hamster recém-nascido)

ASTM-STP (American Society for Testing and Materials Standards)

“O único
onde o sucesso
vem antes do trabalho
é no dicionário”.

Albert Einstein.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	PÁGINA
1	INTRODUÇÃO 24
2	REVISÃO DE LITERATURA 27
3	PROPOSIÇÃO 47
4	MATERIAL E MÉTODOS 49
4.1.	MATERIAL 50
4.1.2.	INSUMOS E SOLUÇÕES 51
4.1.3	FIBROBLASTOS 52
4.1.4	LINHAGEM CELULAR 53
4.2	MÉTODO..... 53
4.2.1	SELEÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS..... 53
4.2.2	MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS..... 54
4.2.3	TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS..... 55
4.2.4	CÁLCULO PARA FORNECIMENTO CELULAR..... 56
4.2.5	SELEÇÃO DOS CIMENTOS 56
4.2.6	PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS..... 59
4.2.7	CONTROLES 60
4.2.8	MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR..... 61
4.2.9	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE..... 61
5	RESULTADOS 66
5.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE..... 67
5.2	MENSURAÇÃO DA CITOTOXICIDADE 67
5.3	PERCENTUAL DA ÁREA DE NECROSE 70

	PÁGINA
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
5.5 CIMENTO AH PLUS®	73
5.6 CIMENTO SEALER 26®	74
5.7 CIMENTO ACROSEAL®	76
5.8 CONTROLES.....	78
6 DISCUSSÃO	81
6.1 LINHAGEM DE CÉLULAS	82
6.2 DA METODOLOGIA.....	83
6.3 DOS RESULTADOS DOS CIMENTOS.....	84
6.3.1 DO CIMENTO AH PLUS®	84
6.3.2 DO CIMENTO SEALER 26®	87
6.3.3 DO CIMENTO ACROSEAL®	90
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

RESUMO

RESUMO

A pesquisa *in vitro* abordada no presente trabalho baseou-se na avaliação da citotoxicidade de três cimentos de uso endodôntico contendo resina epóxica: Sealer 26[®], AH Plus[®] e Acroseal[®]. Para tal experimento, foi realizado o ensaio de difusão em agar com o corante vermelho neutro sobre células L-929, através da semeadura em placas de 6 poços, após 48 horas da manipulação. Transcorridas 24 h em uma estufa umidificada à 37°C com 5% de CO₂, foi constatado a formação de um halo claro ao redor das amostras e dos controles positivos, relativos a citotoxicidade dos espécimes dos cimentos. A medição foi realizada por quadrante, de acordo com o Protocolo Operacional Padrão (POP/FIOCRUZ). Todos os cimentos acima mencionados, apresentaram citotoxicidade, sendo que o cimento AH Plus[®] obteve o melhor comportamento biológico, aferindo menor citotoxicidade, seguido dos cimentos Sealer 26[®] e Acroseal[®]. Os dados estatísticos foram aferidos com a aplicação dos testes ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

Palavras-chaves: cimentos endodônticos, citotoxicidade, células L-929.

ABSTRACT

ABSTRACT

The procedure of this in vitro research based itself on the evaluation of the cytotoxicity of three sealers of endodontic use, epoxic resin base: Sealer 26[®], AH Plus[®] and Acroseal[®]. To such an experiment, after 48 h of manipulation were accomplished by the agar diffusion methodology associated to the red neutral colorant on cells L-929, trough the seeding in appliance of six cavities. After 24 hour in a heater humidificated at 37°C with 5% of CO₂, a clear halo could be seen around the samples and the positive controls, elating to the specimens cytotoxicity of the sealers. The measurement was made according to Operational Protocol Standard POP/FIOCRUZ. All the sealers presented cytotoxicity, but the AH PLUS[®] sealer showed the best biological behavior, estimating the lowest cytotoxicity index followed by the Sealer 26[®] and Acroseal[®] which presented the worse index of biological reactivity. The statistics data were estimated by the application of ANOVA and Student-Newman tests, $p < 0,05$.

Key Words: endodontics sealers; cytotoxicity; cells L-929.

INTRODUÇ,

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, no início do século XIX, vários materiais obturadores foram introduzidos na Endodontia, sendo os metais os mais utilizados. Mas somente após o advento das técnicas radiográficas, a real necessidade de um agente selador do sistema de canais radiculares, no preenchimento de irregularidades e espaços vazios com qualidades de selamento impermeável foi constatada. Inicialmente, usou os cimentos dentinários, a colofônia na modelagem dos canais radiculares, cimentos à base de formalina e fenol, finalmente em 1925, Rickert (apud GROSMAN 1956), veio contribuir cientificamente com o emprego da associação dos cones de gutapercha e cimento endodôntico, no selamento dos canais radiculares, desta forma, aceita até os dias atuais.

Cada vez mais no meio científico, vários cimentos têm sido criados e reformulados, na investigação de melhores propriedades físico-químicas e biológicas, com o propósito de associá-las a obtenção de resultados clínicos endodônticos mais satisfatórios. Segundo os parâmetros biológicos propostos, conforme as especificações do documento nº 41 da American Dental Association/American (ADA/ANSI), citam que os cimentos endodônticos circulantes atualmente no mercado, não apresentam biocompatibilidade com os tecidos periapicais.

O ensaio de citotoxicidade, *in vitro*, é o primeiro teste na avaliação da biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, de acordo com as normas ISO 10993-5. O desenvolvimento de testes de citotoxicidade e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como Food and Drug Administration, em 1993, e Organization for Economic Cooperation and

Development, em 1987, tem favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais de laboratório para o desenvolvimento no campo da pesquisa experimental, *in vitro*, visando a aplicação de vários métodos, que têm sido padronizados pelas organizações American Dental Association (ADA) e Federation Dental International (FDI), tais como: método de difusão, método de extração, método de contato direto, método de inibição metabólica, além dos métodos enzimáticos que assumem relevância no conhecimento de novas composições e propriedades biológicas desses cimentos.

Os princípios básicos da endodontia foram persistentes ao longo do estabelecimento de novas descobertas, visto que, o que de fato se deseja na terapia endodôntica é o controle efetivo da infecção no interior dos canais radiculares. Assim sendo, as células de defesa da região periapical serão responsáveis pela eliminação de todos os irritantes, bactérias residuais, *debris* celulares, produtos de degeneração e partículas residuais dos cimentos seladores dos canais radiculares, sendo o principal objetivo a indução do selamento biológico apical do canal radicular. Tal fato depende da correta execução de todas as etapas de limpeza, modelagem e principalmente da obturação completa dos sistemas de canais radiculares, com um material inerte, anti-séptico, dimensionalmente estável e biologicamente compatível (INGLE, 1961; GUTTUSO e BUFFALO, 1963). Ainda, efeitos adversos advindos dos cimentos, que podem levar insucesso tratamento endodôntico, pelo íntimo contato na interação com os tecidos apicais e periapicais que possam desenvolver efeito citotóxico são pesquisados na literatura. Sendo assim, o objetivo da obturação dos canais radiculares consiste na manutenção da saúde dos tecidos apicais periapicais.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Anteriormente aos anos 80, tiveram destaque as avaliações experimentais direta em dentes de animais e a técnica da implantação em tecido conjuntivo subcutâneo (TORNECK, 1967; LANGELAND et al., 1969; MOLLOY et al., 1992). Diante das dificuldades impostas pelas pesquisas *in vivo*, dentre elas os estudos histológicos, respostas inflamatórias e do hospedeiro, infecção no sítio de implantação do material e outras adversidades que tornaram os testes de biocompatibilidade, *in vivo*, inacessíveis ao controle das variáveis experimentais. O conhecimento de novas aquisições experimentais foi necessário, assim como as exigências dos últimos 20 anos, entre elas a questão social, deslocando o foco da toxicologia da utilização de animais inteiros em pesquisa laboratoriais para células e moléculas de seres vivos, começando assim, a aquisição de novas metodologias. Esses avanços científicos trabalharam junto com fatores sociais e econômicos, no processamento das mudanças da avaliação do risco da segurança e do potencial do produto, convergindo em soluções mais rápidas, mais simples, econômicas e versáteis na investigação da biocompatibilidade *in vitro* (WATAHA, CRAIG e HANKS, 1992; STANLEY, ZIEMIECKI e SPANGBERG, 1993; ARAKI, SUDA e SPANGBERG, 1994 BELTES et al. , 1997; SPANGBERG , 1998)

Strangeways e Fell (1926) foram os primeiros a estabelecerem a técnica de cultura de tecidos *in vitro*, mas somente após 30 anos, os materiais sintéticos foram aplicados na investigação dos problemas toxicológicos.

Exatamente, entre os anos de 1950 e 1960, começaram as primeiras investigações em cultura na avaliação dos materiais dentários, inicialmente usando cultura de tecidos ou órgãos inteiros de frangos e ratos, surgindo assim os estudos

in vivo e *in vitro* de Rappaport em 1964, com a avaliação da reação tecidual, toxicidade celular e capacidade bactericida de alguns materiais de uso endodôntico, testados em quatro metodologias diferentes criando analogias de resultados, em que algumas variáveis foram notadas, mas que exibiram uma resposta razoavelmente uniforme, dentro de cada grupo de teste, quando todos os métodos foram comparados.

Seguem os estudos *in vitro*, com Guess (1965), o precursor da metodologia da difusão em agar usando células L-929, na verificação da reatividade biológica dos biomateriais.

Prosseguiram várias pesquisas de materiais odontológicos com descobertas científicas no conhecimento da citotoxicidade, acorde estudos de Spangberg e Farmington (1973), com as inovações *in vitro*, na implantação de uma nova metodologia de avaliação longitudinal, com o emprego de marcadores radioativos na observação do comprometimento da integridade da membrana, em cultura de células L-929 e HeLa diante dos materiais sintéticos testados.

Mohammad et al. (1978), com aplicação da mesma metodologia, averiguaram a citotoxicidade dos componentes da difusão da solubilidade dos materiais instituindo dois parâmetros para análise da monocamada celular. Vieram assim a considerar a extensão da zona de descoloração e áreas de lises celulares. Os dados de toxicidade celular foram insatisfatórios para o cimento AH 26, com 80% de lise celular, após a sua manipulação.

Em 1978, Bebert (apud SACOMI et al., 2001), em pesquisas *in vivo*, implementou-se alterações na composição do cimento AH 26[®] com a incorporação de 20% de hidróxido de cálcio, na obtenção de melhores qualidades de biocompatibilidade, constatadas em cortes histológicos, com a deposição de tecido

mineralizado em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, sendo logo depois lançado no mercado nacional o cimento Sealer 26[®], a primeira associação de hidróxido de cálcio e resina epóxica .

Algumas considerações são fundamentais para os testes de citotoxicidade como o tipo de contato (direto e indireto), material/células, que devem ser reconsiderados na avaliação dos resultados citotóxicos. Assim sendo, Yesilsoy e Feigal (1985) puderam estabelecer padrões do tamanho do filtro “Millipore” e também, alternativas para a análise da resposta celular, tais como: o diâmetro da zona de inibição, intensidade de manchamento do corante e áreas de lise celular.

Nakamura et al. (1986) associaram 20% de hidróxido de cálcio aos cimentos AH 26[®], Neodyne[®], Canals[®]; a redução da citotoxicidade do cimento Neodyne esteve presente com a menor degradação de células epiteliais, o que não foi observado com os cimentos Canals[®] e AH 26[®] que apresentaram de 85,6 à 99,7% de lise celular.

Em 1988, Schmalz por meio de uma análise descritiva da metodologia de difusão em agar citou as vantagens, desvantagens e, algumas modificações comparando-as com as dificuldades básicas associadas a outros sistemas *in vitro*. Segundo o autor, os benefícios dos métodos de cultura em geral são que as propriedades básicas dos biomateriais podem ser facilmente e, rapidamente avaliadas com um custo baixo, características de todos os sistemas *in vitro*, as quais parecem ser especialmente referenciadas nessa metodologia.

Safavi e colaboradores, em 1989, desenvolveram na avaliação da citotoxicidade *in vitro*, um método longitudinal que estabelece condições à manutenção da viabilidade celular em cultura, na presença de toxinas, por um

período de tempo prolongado, desta maneira estabelecendo possibilidades de quantificar os efeitos químicos tóxicos às células.

Al-Nazhan e Spangberg (1990) investigaram as alterações morfológicas de fibroblastos do ligamento periodontal e de células L-929, as quais foram observadas em microscopia óptica, frente às injúrias químicas dos cimentos endodônticos, quando empregaram o método de liberação de radiocromo. Levaram em consideração as dificuldades encontradas na complexidade das variações químicas dos cimentos que são impostas aos testes de citotoxicidade e, a necessidade de reformulação na abordagem das metodologias atuais empregadas, principalmente quando do lançamento de novos cimentos endodônticos.

Spangberg, Barbosa e Lavigne (1993) usaram o gás cromatógrafo na análise da liberação de formaldeído nas composição dos cimentos N2[®] e AH 26[®], o qual assume um grau de citotoxicidade quando em contato com os fluídos teciduais, resultante da decomposição da hexametenetetramine em dois subprodutos, a amônia e formaldeído, que são participantes no mecanismo de citotoxicidade. Em especial, o cimento N2[®] apresentou excessiva liberação de formaldeído, diferentemente do cimento AH 26[®].

Ainda em 1993, Barbosa, Araki e Spangberg em uma análise conjunta dos efeitos citotóxicos dos cimentos Fillcanal[®], N-Ricket[®], FS[®] e Sealer 26[®] e das metodologias radiocromo e câmara de inserção, em monocamada celular das células L-929 e fibroblastos do ligamento periodontal, constataram a similaridade à situação clínica, com semelhança na infiltração dos cimentos aos tecidos periapicais, quando empregaram a metodologia da câmara de inserção. Em paralelo, os cimentos Sealer 26[®] e o AH 26[®], apresentaram composições químicas similares de baixos índices de degradação tecidual de fibroblastos.

De acordo com investigações *in vitro*, Beltes et al. (1995), a falta de endurecimento e a solubilidade do cimento Sealapex[®], em células L-929 e BHK21/C13, foram os responsáveis pelas alterações morfológicas celulares, com a obtenção de uma menor densidade de células, comparada com o controle, decorrente da alcalinidade do cimento.

Gerosa et al. (1995) verificaram a viabilidade celular dos cimentos endodônticos AH 26[®], Pulp Canal Sealer[®], Rocanal-R2[®], Rocanal-R3[®], Bioseal[®] e Endomethasona[®]. Na instalação de índices de citotoxicidade, os cimentos AH26[®] e Rocanal-R2[®] tiveram resultados tóxicos insatisfatórios, sendo observado um decréscimo acentuado nas taxas de células viáveis no período de uma semana, contudo, no período de duas semanas a taxa de densidade celular de fibroblastos foi mais favorável, em torno de 20%. Entretanto, observaram uma defasagem na taxa de viabilidade celular em relação aos outros cimentos, reflexo da alta citotoxicidade decorrente do maior potencial de degradação celular.

Conforme Granchi et al. (1995), os estímulos negativos dos cimentos de uso endodôntico devem ser considerados na Endodontia, pois são atuantes nas fases de replicação e diferenciação em células osteoblásticas (MG63). Essas alterações têm relação com a manutenção da permanência de patologias periapicais.

Vajrabhaya et al. (1997) avaliaram o método colorimétrico da Sulforodamina B e da liberação de Cr⁵¹. Os resultados evidenciaram o melhor desempenho do corante nos testes de citotoxicidade, devido ao menor custo e facilidade de emprego da técnica.

No mesmo ano Vajrabhaya et al. (1997) pesquisaram duas diferentes espessuras de camadas de células na resposta dos efeitos tóxicos dos cimentos com o corante Sulforodamina B, na possível tentativa de exclusão de uma das etapas

laboratoriais da análise da biocompatibilidade, como exemplo a etapa dos testes *in vivo*, quando empregaram o uso da multicamada na simulação dos tecidos periapicais, onde a difusão dos seladores dos sistemas de canais radiculares instituiria efeitos tóxicos. Porém, respostas similares foram encontradas em ambas as culturas.

Cruz et al. (1998) compararam a sensibilidade dos métodos de difusão em agar e de extração em células RC-IAL (linhagem de células fibroblásticas de rim de coelho) e HeLa (linhagem de células epiteliais de carcinoma de colo de útero humano), onde foram utilizadas 50 amostras de materiais médico-hospitalares, com a finalidade de observar os índices de citotoxicidade por meio dos halos de inibição, ou seja, pelo maior percentual de células mortas. Ficaram evidentes nos resultados encontrados, a prevalência da sensibilidade da linhagem celular RC-IAL e do método de difusão em agar perante aos materiais sintéticos testados.

De acordo com Bratel et al. (1998) foram observados os efeitos alérgicos e imunológicos com a proliferação de células B e T, induzidas quando na presença dos cimentos endodônticos AH 26[®] e Endomethasona[®].

Geurtsen et al. (1998), em pesquisa *in vitro*, analisaram os danos químicos promovidos pelos cimentos endodônticos na análise do crescimento celular com o emprego do método de extração. Duas determinantes foram significativas na efetivação da degeneração celular: o material empregado e a linhagem de células.

Segundo Koulaouzidou et al. (1998), a biocompatibilidade e capacidade de selamento dos cimentos endodônticos são características indicadoras de sucesso clínico na terapia endodôntica. Os autores em pesquisa, *in vitro*, testaram três cimentos à base de resina epóxica, materiais com garantias de propriedades físico-químicas aplicadas desde 1950, assumindo adesividade as paredes dos canais

radiculares. Assim sendo, o AH 26[®] vem sofrendo algumas modificações na sua constituição química, a fim de torná-lo mais biocompatível, a exemplo dos cimentos resinosos TopSeal[®] e AH Plus[®]. Desde então, foram investigados quanto a exposição de danos tóxicos à cultura celular através dos percentuais de células viáveis na Câmara de Neubauer e do espectrofotômetro, o que resultou em efeitos citotóxicos similares dos cimentos AH Plus[®] e Topseal[®].

Osório et al. (1998) testaram a citotoxicidade dos extratos dos cimentos endodônticos e cimentos retrobturadores em cultura de células L-929 e fibroblastos gengivais humano, dimensionados com o emprego do teste metiltetrazolium (MTT) e do cristal de violeta. Os menores índices de riscos biológicos foram apresentados com os cimentos retrobturadores e o maior grau de sensibilidade com as células L-929.

As alterações citotóxicas não são suficientemente consideradas em muitos testes de genotoxicidade e mutagenicidade. Leyhausen et al. (1999), em avaliação simultânea de genotoxicidade e citotoxicidade, julgaram como necessária a interpretação correta da citotoxicidade com parâmetros de checagens adquiridos com o Umu test, de duplos resultados. O mecanismo de citotoxicidade do cimento AH 26[®] têm sido amplamente investigado pelos testes procariontes (Umu e Ames) e eucariontes (DIT, V79) comprovando sua citotoxicidade. Com as mesmas finalidades de conhecimento, a aplicação de testes simultâneos como 3T3 monocamadas, Umu, DIT e Ames foram executados e determinaram ligeira citotoxicidade ou ausência de inibição do crescimento celular quando em análise o cimento AH Plus[®].

A presença de formaldeído nos tecidos estabelece efeitos negativos tais como necrose, inflamação e mutagenicidade e assim, posterga as condições de reparo

biológico aos tecidos periapicais. Leonardo, Silva e Tonomaru Filho (1999) quantificaram a liberação de formaldeído dos cimentos AH 26[®], Endometasona[®], AH Plus[®] e Top Seal[®] com o teste Infravermelho e Espectroscópio Eletrônico. A umidade e temperatura foram fatores afins de correlatas liberações de formaldeído.

Os avanços dos biomateriais nas mais diversas especialidades odontológicas têm sido aplicados na promoção de melhores propriedades biológicas. Telli et al. (1999) encontram ausência de citotoxicidade pesquisando os cimentos à base de fosfato de cálcio (CRCS[®]), no teste metiltetrazolium (MTT) em células L-929. Com efeito, o fosfato de cálcio que tem sido muito utilizado em implantodontia no reparo e defeitos ósseos, osseointegração, reparo de fendas palatinas e na endodontia em reparo de perfurações, apexificação e no capeamento pulpar. Diferentemente, o cimento AH 26[®] apresentou um comportamento agressivo em cultura de fibroblastos nas mais diferentes concentrações conferidas nesta pesquisa.

Em 2000, Azar e colaboradores utilizaram um filtro de alumínio como barreira física entre as células e os cimentos, no impedimento do contato direto dos cimentos endodônticos AH 26[®], AH Plus[®] e OZE[®], em 10 intervalos de tempo com o corante vermelho neutro. Ao observarem na microscopia as mudanças morfológicas celulares e o número de células viáveis no espectrofotômetro, o cimento AH 26[®] desenvolveu desempenho insatisfatório de citotoxicidade no intervalo de 7 dias, com uma redução substancial após esse período. Por fim, o cimento AH Plus[®] apresentou efeitos menos duradouros, isto é, de 1h a 4h, não observados após esse período.

Ainda em 2000, Cohen investigou os resultados de citotoxicidade dos cimentos AH Plus[®] e AH 26[®], com o método de difusão em agar com aplicação de filtros de papel estéreis, apontando os componentes bisfenol e amina, atuantes nos níveis

de avaliação da citotoxicidade, embora estes sejam integrantes necessários no processo de polimerização das resinas epóxicas.

Huang et al. (2000) mensuraram a viabilidade celular pela ação da enzima intracelular desidrogenase láctica (DHL), em cultura de células, com o uso dos cimentos endodônticos AH 26[®] e AH Plus[®] que apresentaram potencial adverso em hepatócitos de ratos, quando adicionaram 0,04% do cimento AH 26 e 0,1% do cimento AH Plus[®]. A presença de alterações morfológicas foi mais persistente com o cimento AH 26[®].

Leonardo et al. (2000), segundo suas conclusões em pesquisa *in vitro*, a solubilidade dos cimentos foi determinante na análise da citotoxicidade, dimensionada com os níveis de peróxido hidrogênio, produto resultante da fagocitose dos cimentos, na aplicação do método Elisa, utilizando os cimentos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex[®], CRCS[®], Apexit[®] e Sealer 26[®]), e um cimento à base óxido de zinco e eugenol (Fill canal[®]), semeados em cultura de macrófagos da cavidade peritoneal de ratos. Na finalização dos resultados, os cimentos Sealapex[®] e Apexit[®] obtiveram o maior grau de citotoxicidade, diferentemente do cimento Sealer 26[®].

Miletić et al. (2000), com o emprego de 0,01 mL dos extratos dos cimentos AH Plus[®], AH 26[®], Diaket[®] e Apexit[®], buscaram a investigação dos efeitos citotóxicos em cultura de células HeLa e L-929. Os danos químicos às células foram estimados no microscópio, com leitura de resultados na taxa de sobrevivência celular, nos intervalos de tempo de 24h, 48h e 120 h. Desde então, o cimento AH Plus[®] apresentou alto potencial de degradação celular e, até mesmo, em igualdade de percentuais tóxicos com o cimento AH 26[®].

Conforme as diretrizes internacionais, os dispositivos médicos devem ser investigados nos aspectos mutagênicos e genotóxicos, portanto Schweikl e Schmalz (2000) testaram a formação de nucléolos com o extrato do cimento AH Plus[®] nas diluições de dimetilsulfóxido (DMSO) e do cloreto de sódio, uma alternativa ao teste de mutações cromossomiais. A citotoxicidade e mutagenicidade às células V79 foram inferidas à cabo do solvente na diluição das amostras dos cimentos. Foram evidentes as diferenças nos resultados dos extratos do cimento AH Plus[®] diluído em cloreto de sódio, que apresentaram níveis de citotoxicidade 10 vezes menor do que com as diluições em DMSO.

Poucos estudos *in vitro* tem sido direcionados para a avaliação dos efeitos dos componentes dos cimentos endodônticos no sistema celular, assim como as alterações das características funcionais e morfológicas no tecido conjuntivo, que são moduladas pelas endotoxinas que induzem inflamação acompanhada pelo aumento da produção de prostaglandinas E₂ (PGE₂). Willershausen et. al. (2000) advertiram que a presença de hidróxido de cálcio na composição dos cimentos favorece a alcalinidade do meio de cultura, o que ocasiona variação da liberação de prostaglandinas E₂. O potencial da liberação de prostaglandinas foi estabelecido pelo cimento pesquisado e a linhagem de células na biocompatibilidade dos cimentos Sealapex[®], Endion[®], Super-Eba[®], Ketac-Endo[®], AH Plus[®] e mais um cimento à base de hidróxido de cálcio e guta-percha. Destacaram os fibroblastos humanos diplóides como modelo apropriado para as pesquisas, *in vitro*, nos testes de novos materiais.

Figueiredo e colaboradores em 2001 observaram através da análise histológica pelas metodologias de implantação com as técnicas de tubos de polietileno e da injeção na mucosa que os cimentos N-Ricket[®], Fillcanal[®], AH 26[®] e Sealer 26[®], que

a adição de hidróxido de cálcio, na composição dos cimentos resinosos, associa características físico-químicas amplamente favoráveis levando a uma melhor resposta biológica participativa no processo de cicatrização.

Hunag, Lii e Kao (2001) avaliaram os níveis de Glutathione (GSH) e o stress oxidativo, com infiltração de desidrogenase láctica, em hepatócitos de ratos, que foram referências no comprometimento da integridade da membrana celular mitocondrial, na presença dos cimentos endodônticos Canals[®], Sealapex[®], AH 26[®] e AH Plus[®], a exemplo da citotoxicidade de substâncias e degradação de seus produtos. Níveis mínimos de concentrações de Glutathione (GSH) são promissores à ruptura da estrutura do DNA celular, com subsequente evento de apoptose. A adição de um agente antioxidante talvez ofereça um aumento na viabilidade celular, segundo esses autores.

Sacomi et al. (2001) investigaram uma nova proposta de biocompatibilidade através da adição de 20% de hidróxido de cálcio ao cimento Sealer 26[®]. Apesar das excelentes propriedades desse fármaco, as diferenças biológicas não foram significativas entre os cimentos Sealer 26[®] e Sealer 26[®] Modificado.

A biocompatibilidade dos materiais é pesquisada em três etapas: em cultura de células, implantação em tecidos e aplicação em vivo, sendo a execução das duas últimas etapas dependentes do potencial citotóxico dos materiais a serem pesquisados. Tai, Huang e Chang (2001) avaliaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus[®], Canals[®] e N2[®], em duas culturas de células primárias humanas de fibroblastos orais, e na linhagem de células permanentes de hamster (V79). O cimento AH Plus[®], substituto do cimento AH 26[®], apresentou-se citotóxico nas três linhagens de células, devendo-se tal fato a permanência da resina epóxica

em sua fórmula. Em uma escala de níveis crescentes de citotoxicidade os resultados encontrados foram: AH Plus[®] < Canal[®] = N2[®].

Novas alternativas de avaliação dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* tem sido regulamentadas por algumas organizações reconhecidas mundialmente, como a American Dental Association/American (ADA/ANSI) e a International Standard Organization (ISO), entretanto, novas metodologias surgem buscando a facilidade dos procedimentos no campo da pesquisa biológica. Senne (2001) em pesquisa laboratorial avaliou a viabilidade e as alterações morfológicas em fibroblastos, perante os cimentos endodônticos Sealer 26[®], AH Plus[®] e o Endofill[®], em três intervalos de tempo. Simultaneamente, comparou a sensibilidade de dois métodos de coloração: o azul de Trypan e um corante fluorescente à base de brometo de etídio. A menor capacidade de citotoxicidade estabeleceu-se com o cimento AH Plus[®]. As duas metodologias aplicadas foram eficazes na checagem dos resultados tóxicos dos cimentos apresentados. As composições dos cimentos Endofill[®] e Sealer 26[®] apresentaram maior sensibilidade com o uso do corante FluoroQuenct[™].

Holland et al. (2002) usaram o teste Von Kossa empregando os cimentos MTA[®], CRCS[®], Sealapex[®], Sealer 26[®] e Sealer Plus[®] com a proposta de observar a formação de estrutura mineralizadas. Segundo afirmativa dos autores, todos os cimentos exibiram estruturas mineralizadas, quando consideraram os índices de deposição de sais de cálcio nos períodos de tempo de 7 à 30 dias.

Conforme observações de Huang et al. (2002), os cimentos AH 26[®], AH Plus[®], Canals[®] e Sealapex[®] foram capazes de inibir a atividade metabólica quando usado o método de redução do tetrazolium bromide em células do ligamento periodontal humano (PDL) e células permanentes V79, em períodos de tempo de 1, 2, 3 e 7 dias. Assim sendo, listaram os cimentos em ordem decrescente de citotoxicidade

Sealapex[®], AH Plus[®], AH 26[®], Endometasona[®] e N2[®], ao mesmo tempo observaram que a solubilidade dos materiais infere na inibição da atividade metabólica das células.

Segundo Neff, Layman e Jeansonne (2002), a temperatura é um fator predominante na adesão, na proliferação celular e na diferenciação tóxica dos cimentos endodônticos, portanto propôs observar em pesquisa *in vitro*, com o emprego do teste Cy Quant^R, a relação do aquecimento da técnica de obturação da condensação vertical com os danos causados nos produtos constituintes dos cimentos como o eugenol, formaldeído e alguns íons dos cimentos endodônticos AH Plus[®], AH 26[®], Roth 801[®], Roth 811[®], Kerr Pulp Canal Sealer[®], Sealapex[®] e Dentalis[®]. A ação da temperatura, desde que elevada, deve ser considerada na proliferação e adesão das células perante os cimentos AH Plus[®] e AH 26[®].

Segundo Pulgar, (2002), as alterações nas funções endócrinas e imunológicas estiveram presentes na avaliação dos resultados de citotoxicidade dos cimentos AH 26[®] e AH Plus[®]. Os efeitos biológicos negativos constantes nos cimentos devem-se de fato ao monômero BisGMA, o maior componente dos seladores endodônticos em questão, à partir do Bisfenol A (BPA) e do metacrilato de glicidila (GMA). As concentrações dos cimentos, *in vitro*, devem ser ponderadas na clínica endodôntica.

Schwarche, Leyhausen e Geurtsen (2002) aferiram o desempenho da inibição do metabolismo da mitocôndria no teste da compatibilidade de cinco cimentos endodônticos: N2[®], Endometasona[®], Apexit[®], AH Plus[®] e Ketac Endo[®]. Os cimentos N2[®] e Endometasona[®] tiveram comportamentos desfavoráveis perante as linhagens 3T3 e de fibroblastos do ligamento periodontal, em qualquer intervalo de tempo. O extrato do cimento AH Plus[®] proporcionou uma maior magnitude na

inibição da atividade mitocondrial nos períodos de 0h, 1h e 5h, todavia, após esse intervalo, ratificou moderada e inclusive ausência de citotoxicidade.

Camps e About (2003) usaram as diretrizes da ISO e a técnica “root- dipping” no exame da citotoxicidade dos cimentos AH Plus[®], Cortisomol[®] e o Sealapex[®], em células L-929. A discrepância dos valores numéricos encontrados deve-se a diferença da interface material/células nas metodologias envolvidas nessa pesquisa, a ausência de reatividade celular nas metodologias propostas esteve direcionada para o cimento AH Plus[®].

Gambarini et al. (2003) investigaram a citotoxicidade do FibreFill[®], que possui as características clínicas de duplo uso, ou seja, de selador endodôntico e de cimento de núcleos de fibra para restauração coronária, comparando-o com Acroseal[®] e Bioseal[®]. Empregaram amostras dos cimentos em cultura de fibroblastos de ratos (3T3) para verificar a vitalidade celular com o teste da captação do vermelho neutro (NRU), que avalia a permeabilidade da membrana. Os melhores resultados alcançados, em grau de citotoxicidade em escala de valores crescentes, foram encontrados com os cimentos Acroseal[®], Bioseal[®] e FibreFill[®]. Estatisticamente não foram encontradas diferenças significantes entre os materiais pesquisados.

O pó e o líquido de alguns materiais de uso odontológicos foram utilizados no ensaio de citotoxicidade em células L-929, na verificação da integridade das mitocôndrias e dos lisossomos em presença da química desses componentes. A redução da viabilidade celular e o aumento na sensibilidade no metabolismo das mitocôndrias foram mais notáveis quanto aos riscos biológicos, na presença dos líquidos dos cimentos (LÖNNROTH e DAHL, 2003).

Miletić et al. (2003) cultivaram células V79 com as diluições dos cimentos AH Plus[®] e AH 26[®], levando em consideração os padrões citogenéticos e a resposta celular. Com a proposta de avaliar os cimentos, foram encontrados os seguintes resultados: a) os cimentos foram altamente citotóxicos nas concentrações 55.7, 167 e 16.7 g mL⁻¹ nos períodos de 1h, 24 h e 7 dias; b) os efeitos tóxicos foram progressivamente reduzidos no período de 7 dias para o cimento AH 26[®], enquanto no cimento AH Plus[®] somente ocorreu após uma semana e c) nenhum dos cimentos induziram aumento significativo na aberração cromossomial ou na indução de nucléolo em qualquer período de tempo ou concentração.

Öztan et al. (2003) utilizaram a capacidade enzimática das mitocôndrias na análise do percentual de sobrevivência celular (OD) e a contagem de células viáveis com o corante azul de ryan, na avaliação da citotoxicidade. Os resultados encontrados foram contraditórios, certamente decorrente da maior sensibilidade do teste colorimétrico, capaz de detectar as menores quantidades de substâncias tóxicas dos cimentos, que incidiram no comportamento celular nos intervalos de tempo de 24h e 48 h e 24h e 72 h, quando usados os cimentos AH Plus[®] e RSA[®]. Em contrapartida, não encontraram diferenças estatísticas entre os cimentos na metodologia do MTT, em qualquer intervalo de tempo.

Rogero et al. (2003) tiveram como finalidade de estudo *in vitro*, a comparação de duas metodologias em cultivo de células NCTC Clone 929 (American Type Culture Collection), quando empregaram o ensaio de citotoxicidade com a incorporação do corante vermelho neutro e a difusão em agar em alguns biomateriais poliméricos, cerâmicos e metálicos. As duas metodologias foram equivalentes, mas apenas pequenas diferenças de resultados foram notadas, sendo determinadas pelo tempo de extração.

Al-Awadhi et al. (2004) verificaram alterações na morfologia das células primárias de osteoblastos quando na presença dos cimentos endodônticos, com estabelecimento de duas metodologias distintas, traçando um diferencial para os processos de necrose e apoptose com o emprego do azul de Trypan e o Capase-3.

Bouillaguet et al. (2004) fundamentaram sua pesquisa na avaliação da citotoxicidade de quatro classes de cimentos de uso endodôntico (óxido de zinco e eugenol, resina epóxica, silicone e ionômero de vidro), utilizando o teste MTT na verificação do dano celular e o corante Rodamina-B para marcação da infiltração do LPS (lipopolissacarídeos) com relação à capacidade seladora desses materiais, acorde esses autores o LPS é o maior fator de virulência da bactéria gram negativa, responsável pela ativação do processo inflamatório e pela resposta humoral imune. Interferências na estabilidade do selamento, seguramente irão exprimir oscilações no comportamento dos tecidos periapicais, decorrentes da ação de seus componentes.

Huang et al. (2004), para avaliar as mudanças intracelulares, certamente decorrentes do stress oxidativo da complexa variedade química dos cimentos AH Plus[®], Sealapex[®] e Canals[®], usaram hepatócitos de ratos na investigação das duas vias de danos celulares: necrose e apoptose, que são dependentes da quantidade dos estímulos oxidativos à cultura OC₂. Sem dúvida, a contribuição dos estímulos oxidativos aferiu efeitos citotóxicos observados na leitura ao microscópio, informando uma diminuição na densidade celular. Em contrapartida não constataram alterações nos padrões citogenéticos, como o evento da apoptose celular.

Valera et al. (2004) observaram a biocompatibilidade de alguns cimentos endodônticos como o Sealapex[®], Apexit[®], Sealer 26[®] e Ketac Endo[®] com a implantação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, na constatação da resposta

tecidual nos períodos de tempos de 14 e 90 dias, com base na predominância e no comportamento celular da resposta inflamatória nos tecidos. O cimento Sealer 26[®] apresentou as melhores respostas, com os menores índices de magnitude inflamatória geral, em 14 dias e 90 dias do experimento. Em 14 dias, o Ketac Endo[®] obteve resultados desfavoráveis e, os maiores índices no grau de magnitude da inflamação geral foram alcançados pelo cimento Sealapex no período de 90 dias.

Huang e Chang (2005) investigaram a infiltração do Glutathione (GSH), participante na prevenção de danos às células U2OS, quando na presença de agentes oxidantes das resinas epóxicas, responsáveis pela instalação de efeitos lesivos das prostaglandinas que tenham sido ativadas pela COX-2. Os níveis de GSH estão implicados na diminuição da indução da COX-2, do gene de expressão mRNA e da citotoxicidade em cultura de células.

Segundo Huang et al. (2005), os cimentos N2[®] e AH Plus[®] tiveram a capacidade de induzir a produção dos níveis de interleucina-6 e interleucina-8 em células osteoblásticas presentes nos processos inflamatórios periapicais, verificadas a partir do teste RT-PCR.

Miletić et al. (2005) compararam o efeito citotóxico dos cimentos endodônticos Roeko Seal[®] e AH Plus[®] em células de carcinoma humano (HeLa) e fibroblastos de ratos (L-929) em diferentes períodos, ou seja, 1h, 24 h, 48h , 7 dias e 30 dias. A fim de interpretar o resultados, a microscopia e o contador eletrônico assinalaram a maior degradação celular na comprovação dos riscos biológicos que foram apresentados nos períodos de 1h, 24h e 48h, comparativamente aos períodos de 7 e 30 dias, porém sem diferenças significativas em relação ao grupo controle nesse intervalo de tempo, em ambas as linhagens de células, com o cimento AH Plus[®].

O íntimo contato de substâncias de uso endodôntico com os tecidos periapicais, beneficiado pela anatomia dos canais radiculares, encontra nos testes de biocompatibilidade a verificação das respostas celulares quanto a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns materiais usados na clínica endodôntica, assim sendo testados por Gahya e Siqueira Júnior (2005), que usaram dois sistemas procariontes: teste Ames e o SOS Chromotest, na análise dos cimentos AH Plus[®], Sealer 26[®] e outros materiais auxiliares para a prática endodôntica, porém os riscos de citotoxicidade não atuaram em cultura de células quando do emprego desses cimentos.

Os macrófagos são células presentes no mecanismo de defesa do organismo, envolvem-se no processo de fagocitose de corpos estranhos e de várias substâncias pro-inflamatórias, expressando limites biológicos no reparo periapical. Assim, Queiroz et al. (2005) usaram cultura de macrófagos peritoneais de camundongos para detectar os efeitos dos cimentos Sealer 26[®] e do Endofill[®], na indução de óxido nítrico. Sob estas circunstâncias, a concentração de 0,1 mg/ml foi insuficiente para estimular a liberação de óxido nítrico, porém, em concentração de 180mg/ml, efeitos letais foram relevantes, devendo-se ao fato da resina bisfenol e amina serem inerentes à decomposição de amônia e formaldeído.

Os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio combinado com guta-percha sempre foram permissivos à infiltração apical. Deve-se esse fato à deficiência de selamento e adesividade as paredes do canal radicular. A ausência de qualidade e longevidade do selamento desses materiais levaram Bouillaguet et al. (2006), a avaliar novos cimentos com formatação de monoblocos, na verificação da resposta biológica, perante os espécimes dos materiais AH Plus[®], Resilon[®], Epiphany[®], GutaFlow[®] e seus respectivos primeres.

As novas composições dos seladores endodônticos devem ser a associação das excelentes propriedades de selamento e adesividade dos cimentos à compatibilidade biológica aos tecidos circundantes.

Queiroz et al. (2006) quantificaram a síntese de óxido nítrico em cultura de macrófagos com a suspensão dos cimentos à base de resina epóxica e hidróxido de cálcio. O óxido nítrico é um subproduto da fagocitose, referência de toxicidade às células, participante do mecanismo de manutenção da resposta inflamatória no periápice, com agregação de destruição tecidual. A maior amplitude de agressão tecidual foi correlacionada com os cimentos à base de resina epóxica.

Merdad et al. (2007), em pesquisa de curto prazo, avaliaram comparativamente, o sistema de obturação do cimento Epiphany[®] e do cimento AH Plus[®] e guta-percha com metodologias de contato direto e indireto em células HeLa. Um decréscimo na viabilidade celular foi conferido quando os cimentos AH Plus[®] e Epiphany[®] foram semeados, na condição de mistura fresca, em cultura de células entretanto, o primeiro cimento citado apresentou maior redução celular.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa tem como objetivo analisar *in vitro*, a citotoxicidade em células L-929 perante três cimentos de uso endodôntico à base de resina epóxica associados ao hidróxido de cálcio, com base na metodologia de difusão em agar utilizando como corante o vermelho neutro.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- agitador magnético;
- autoclave;
- balança analítica;
- banho-maria;
- bico de bunsen;
- câmara de Neubauer;
- caixa de isopor;
- estufa de CO₂;
- estufagem de secagem;
- fluxo laminar vertical;
- frasco de cultura;
- forno;
- frascos criogênicos plásticos;
- microscópio invertido (Nikon Eclipse Ts 100);
- papel alumínio;
- régua milimetrada;
- pinças cirúrgicas;
- pipetador automático;
- pipetas Pasteur;
- pipetas sorológicas;
- placas plásticas (3,5 cm de diâmetro);

- potenciômetro;
- termômetro;
- tesoura;
- vidrarias: erlenmeyer, béquer e proveta;
- Unidade de filtração;
- Protótipo de silicone com 6 poços com dimensões 5mM x 1mM;
- Protótipo de silicone com 6 poços com dimensões 1mM x 1mM
- hidrocór dermatográfico;
- placa de vidro;
- espátula de cimento nº 24;
- espátula nº 1;
- máquina fotográfica;
- filme Kodak (Asa 100);
- programa Image Tool;
- programa Estatístico Primer.

4.1.2 Insumos e Soluções

- cimentos obturadores de uso endodôntico: Sealer 26[®], AH Plus[®] e Acroseal[®];
- células L-929 (fibroblastos de camundongos);
- solução de Ácido Crômico;
- solução tampão de fosfato PBS;
- solução de L-Glutamina 200mM;
- soro fetal bovino;
- solução antibiótica de Penicilina 10⁴ UI/mL e Estreptomicina 10⁴ ug/mL;

- solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%;
- MEM 1 x concentrado;
- MEM 2 x concentrado;
- MEM completo 1 x concentrado:
- agar 1,8% com 0,01% de vermelho neutro;
- meio de cobertura;
- solução de cloreto de sódio 0,9%;
- meio de congelamento com glicerol;
- teflon;
- látex para garrote.

4.1.3 Fibroblastos

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo de muitos animais, de origem mesenquimal são precursores de outras células como: ósseas, adiposas e musculares. Apresentam-se de forma heterogênea dependendo do sítio de localização e assim como de sua atividade. Morfologicamente configuram com citoplasma ramificado, núcleo elíptico com a presença de 1 ou 2 nucléolos mitocôndrias com aspecto de bastonetes e retículo endoplasmático abundante e áspero quando ativo. Os fibrócitos são fibroblastos inativos com retículo endoplasmático reduzido, ainda com aspecto áspero e dispersivo quando têm que cobrir grandes áreas. São responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular, com produção de fibras protéicas e da substância amorfa que ocupam o interstício dos tecidos conjuntivos. Têm a função de preservar a integridade da estrutura do tecido conjuntivo, são participantes no processo de cicatrização do

sistema orgânico e apresentam grande quantidade de actina, miosina e actinina. Os danos celulares são os responsáveis pela estimulação de fibrócitos e mitoses de fibroblastos. Prolifera-se facilmente, característica diferenciada pela qual são preferencialmente usados em pesquisa biológica (FRESHNEY, 2000).

4.1.4 Linhagem Celular

A linhagem de células L-929, empregadas nesse experimento são originárias do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz. Trata-se de uma linhagem que foi aceita e faz parte da Coleção Americana de Tipos de Culturas Celulares (ATCC, Rockville, MD, EUA), desde 1961. A ATCC tornou-se o primeiro centro biológico, distribuidor mundial autorizado de material de referência biológica, tendo foco de atuação na aquisição, desenvolvimento, preservação, autenticação e distribuição de materiais para pesquisas nas ciências.

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção da Cultura de Células

Em toda ciência experimental, a pesquisa da biologia celular depende de processos e técnicas laboratoriais, são muito mais difíceis em animais do que em microrganismos, estabelecidas pela variabilidade de células que necessitam de um meio de cultura mais complexo. Em 1955, Harry Eagle faz a primeira investigação sistemática das exigências nutritivas essenciais para as células em cultura e

constata que as células animais podem propagar, em uma mistura definida de moléculas, suplementadas com uma proporção pequena de proteínas do soro, definindo o primeiro meio de sustentação de crescimento de células animais em cultura, constituídos de sais de glucose, aminoácidos, vitaminas e soro, sendo dependentes do ambiente experimental para crescimento, manipulação e manutenção de suas características. As células derivadas de tumores proliferam-se indefinidamente em cultura, denominadas **linhagem de células imortais**, assim como os fibroblastos de ratos (L-929) aplicáveis constantemente em pesquisa laboratoriais na observação dos efeitos toxicológicos dos materiais odontológicos (figura 1).

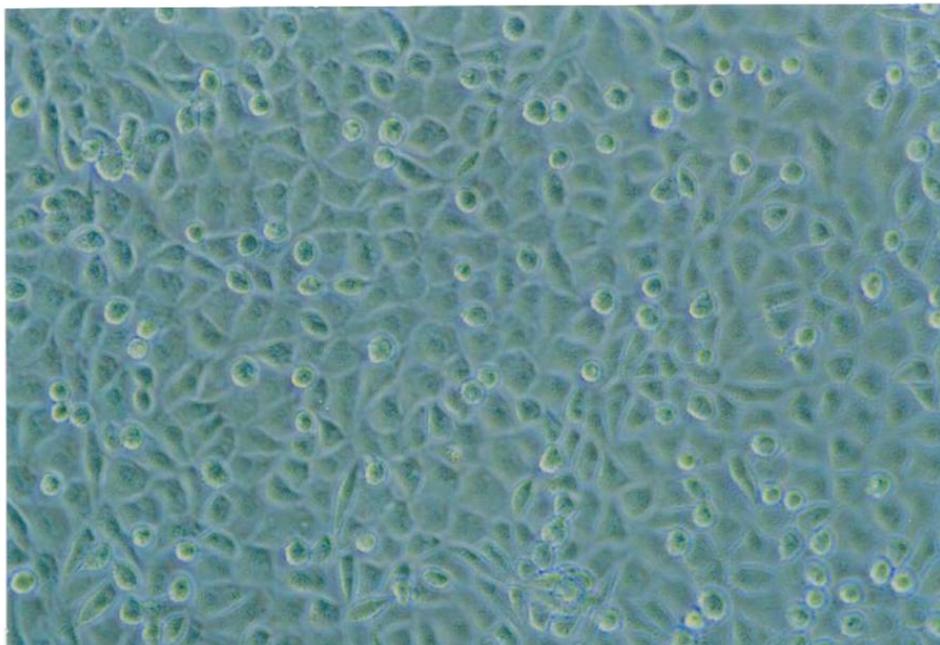


Figura 1. Tapete Celular de fibroblastos de Ratos (L-929) 100X.

4.2.2 Manutenção das Células

Inicialmente, a linhagem de células L-929 foi mantida congelada em frascos criogênicos plásticos com glicerol, (agente crioprotetor) em tambores de nitrogênio líquido, passando pelo processo de descongelamento em banho-maria à 37°C. Logo

após, foram armazenadas em garrafas de cultura com 5 mL de meio essencial mínimo completo, com sais de Earle – Sigma M 0268 (MEM 1 x concentrado) com constituição de 5% v/v de soro fetal bovino, 100 ug/mL de sulfato estreptomicina, 100 UI/mL de Penicilina G potássica e 2 mM de L- glutamina, colocadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂, 100% de humidade relativa do ar, para obtenção de uma monocamada celular. O ensaio de citotoxicidade foi transcrito depois de dois subcultivos posteriores ao descongelamento (figura 2).

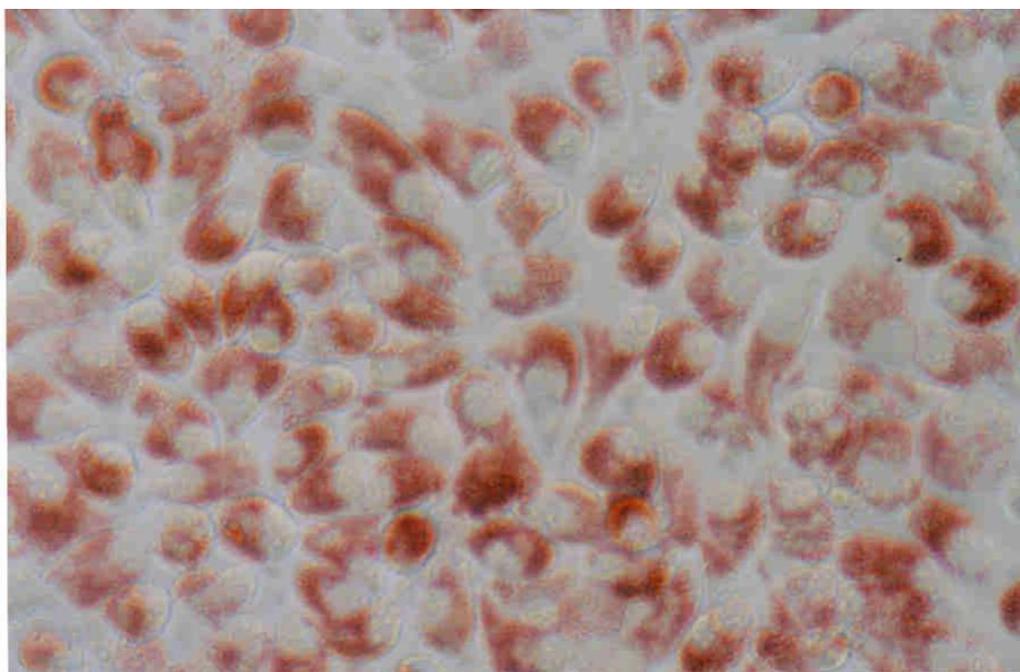


Figura 2. Linhagem L-929 (400X).

4.2.3 Tripsinização das Células

O tratamento das células com solução de tripsina a 0,125% com EDTA 0,025%, na promoção do destacamento de células das garrafas de cultura, deu-se após a remoção do MEM completo 1 x concentrado e com a lavagem da monocamada celular com 5mL de MEM 1 x concentrado, sem adição de soro fetal

bovino. Após a verificação do arredondamento e da separação das células, se fez necessária a retirada da tripsina e a colocação de 10 mL de MEM completo 1 x concentrado. As lavagens foram efetuadas de 5 a 10 vezes com pipeta para a obtenção de uma suspensão homogênea conseguida nesse processo de individualização das células.

4.2.4 Cálculo para fornecimento celular

Os cálculos para o fornecimento celular foram dimensionados no microscópio invertido com o auxílio da câmara de Neubauer, na concentração inicial celular de $2,65 \times 10^6$ cel/mL e viabilidade de 91,7%. Seguem abaixo os itens discriminados para o cálculo do fornecimento celular da suspensão final de $3,06 \times 10^5$:

$$[(60 \text{ ml } (V_s) \times 3 \times 10^5 \text{ cel/ml } (C_s))]$$

$$2,625 \times 10^6 \text{ cel/ml } (C_i)] = 6,8 \text{ ml (volume a adicionar } (V_a)$$

Volume Celular suficiente para realizar o ensaio? (x) sim

$$\text{Contagem da Suspensão Final: } [(145) + (122)] / 8 = 33,37 \text{ (M)}$$

$$\text{Concentração Celular} = [(33,37) \text{ (M)} * (91,7) \% \text{ (viabilidade celular)} / (100)] \times 10^4 = 3,06 \times 10^5 \text{ células/ml.}$$

Volume: 60 ml / 107 passagens

4.2.5 Seleção dos Cimentos

A escolha dos cimentos de uso endodôntico foi de acordo com as informações obtidas na literatura científica (KETTERING e TORABINEJ, 1984; FIDEL, 1993; VERSIANI *et al.*, 2006), com fundamentação nas propriedades físico-químicas, e

conjugando-as às propriedades biológicas, tão almejadas no emprego da clínica odontológica, na especialidade endodôntica. Os cimentos utilizados nessa pesquisa, *in vitro*, foram Sealer 26[®], AH Plus[®] e Acroseal[®], à base de resina epóxica associados ao hidróxido de cálcio, sendo este último lançado recentemente no mercado nacional (figuras 3, 4 e 5). As fórmulas dos cimentos estão dispostas na tabela 1, de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes.

Cimento	Apresentação	Fórmula
AH PLUS [®] DENTSPLY Lote:0603002042	Pasta A	Bisfenol-A resina epóxi Bisfenol-F resina epóxi Tungstenoato de cálcio Óxido de Zircônia Sílica Pigmentos de óxido de Ferro
	Pasta B	Dibenzildiamine Aminoadamantane Tryclodecane-diamine Óxido Zircônio Sílica Óleo de Silicone
SEALER 26 [®] DENTSPLY Lote:611673	Pó	Trióxido de Bismuto Hidróxido de Cálcio Dióxido de Titânio
	Resina Epóxi	Epóxi Bisfenol
ACROSEAL [®] SEPTODONT Lote:3 063	Base	Ácido Glicirrético (enoxolona) Metenamina Excipiente radiopaco q.s.p
	Catalisador	Hidróxido de Cálcio Diglicidileter de Bifenol A Excipiente radiopaco q.s.p.

Tabela 1. Marca Comercial, Composição Química e Fabricantes dos cimentos



Figura 3. Apresentação comercial do Sealer 26®



Figura 4. Apresentação comercial do cimento Acroseal®



Figura 5. Apresentação comercial do cimento AH Plus®

4.2.6 Padronização das Amostras

A padronização das amostras teve como finalidade estabelecer as dimensões dos cimentos em 5mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, obtidas de um padrão projetado da confecção de uma matriz de gesso que criou três protótipos de silicone (figura 6) para a reprodução de um dispositivo de armazenamento e padronização dos cimentos quando em mistura fresca, até o início do ensaio ocorrido após 48h.



Figura 6. Fotos dos modelos de padronização das Amostras de 5mm (A e B). Padronização das amostras de 1mm (C).

De acordo com as diretrizes do Protocolo Padrão Operacional, as amostras configuravam dimensões de 5mM x 1 mM, porém a alta citotoxicidade do material que refletiu na lise celular total da placa, invalidou o ensaio de citotoxicidade com a necessidade de redução do tamanho das amostras para 1mM X 1mM.

4.2.7 Controles

As diretrizes de regulamentação da UNITED PHARMACOPEIA (USP), referenciadas no Protocolo Operacional Padrão do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz determinaram a seleção dos controles positivo e negativo que confirmaram a validade do ensaio experimental (figura 7). Três poços foram designados para os controles, com a seguinte distribuição:

- a) controle positivo – látex para garrote, biologicamente reativo.
- b) controle negativo – teflon, biologicamente não reativo.
- c) Controle de células – células L-929 com o agar associado ao corante vermelho neutro.



Figura 7. Controle Negativo e Controle Positivo

4.2.8 Método de Difusão em Agar

A partir da 22ª Revisão da Farmacopéia, o ensaio de difusão em agar foi introduzido como teste de reatividade biológica, *in vitro*, em cultura de células mamíferas para a avaliação de materiais plásticos, elastômeros e polímeros de uso médico e hospitalares. O presente ensaio de citotoxicidade baseou-se nas especificações do Comitê ISO 10933-5, reunido em 31/05/1996 e no protocolo de Procedimento Operacional Padrão (POP) da Fundação Oswaldo Cruz do Departamento de Imunologia, com o emprego de uma metodologia de contato indireto, com a aplicação de uma camada protetora formada com 1,8 ml de agar associado a 0,01% de corante vermelho neutro, o qual não permite danos mecânicos à camada celular, permitindo porém, a difusão das substâncias químicas dos materiais (amostras) para a cultura de células, a fim de obter uma análise qualitativa de dados de citotoxicidade.

O grau de difusão das substâncias químicas e o crescimento celular estão diretamente relacionados com a quantidade e qualidade do meio de cultura, que não deve exceder a mais de 20% de agar, fatores que foram considerados nessa metodologia.

4.2.9 Ensaio de citotoxicidade

A análise de resultados do ensaio de citotoxicidade transcorreu após 24 h, com a utilização de três placas constituídas de seis poços cada uma, para a acomodação de 2 mL da suspensão celular na concentração de $3,06 \times 10^5$ conjuntamente com 5 mL de MEM completo 1 x concentrado (5% v/v de soro fetal bovino, 100 ug/mL Sulfato de estreptomicina, 100 UI/mL de Penicilina G Potássica e

2 mM de L- glutamina, 2,2g de Bicarbonato de sódio, 1N de ácido clorídrico), semeadas no período de 48 h que ofereceu uma monocamada uniforme e com confluência superior à 80%

Em todo período de manipulação do ensaio de citotoxicidade, usou-se a capela de fluxo laminar, a qual trouxe condições assépticas pela conjugação de ar filtrado, agentes esterilizantes e luz ultravioleta. Em seguida, o meio de cultura das placas foi aspirado com pipeta, e 2 mL de solução fosfatada básica (PBS), foram utilizadas para a lavagem da monocamada celular. Após esse procedimento, transcorreu a aspiração com pipeta da solução fosfatada básica (PBS) dos poços (figura 8A), seguida da inserção de 1 mL do meio de cobertura (figura 8C) com os seguintes constituintes: MEM duas vezes concentrado e o agar (Difco) 1,8% associado à 0,01% de vermelho neutro, minutos antes do ensaio foram misturados, em proporções iguais, e fundidos em microondas por 1 minuto em temperatura de 44°C. A espera da solidificação do agar decorreu em 15 minutos sem a presença da luz, fator fotoativador que promove danos celulares à cultura. A descrição da distribuição das placas tiveram a seguinte configuração: 3 discos dos espécimes dos cimentos (figuras 8H e 8I), 1 controle positivo (C+) (figura 8B), 1 controle de células (CC) e 1 controle negativo (C-) (figuras 8B, 8E, 8F e 8G) que foram colocados com pinças cirúrgicas na superfície solidificada do agar (figura 8D). Logo após as placas foram cobertas com papel alumínio e acomodadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ (figura 8J), no período de 24 h, quando foi necessária a utilização do microscópio invertido para a análise da validade do ensaio experimental com os aumentos 40X, 100X, 200X e 400X (figura 8L).



Figura 8. A. Lavagem com PBS. B. Controle Negativos e Positivos. C. Agar com VN. D Colocação das espécimes dos cimentos.



Figura 8 E, F e G. Espécimes dos cimentos em cultura L-929. H. Espécimes dos cimentos de 5mM de diâmetro. I. Espécimes dos cimentos de 1mM de diâmetro.

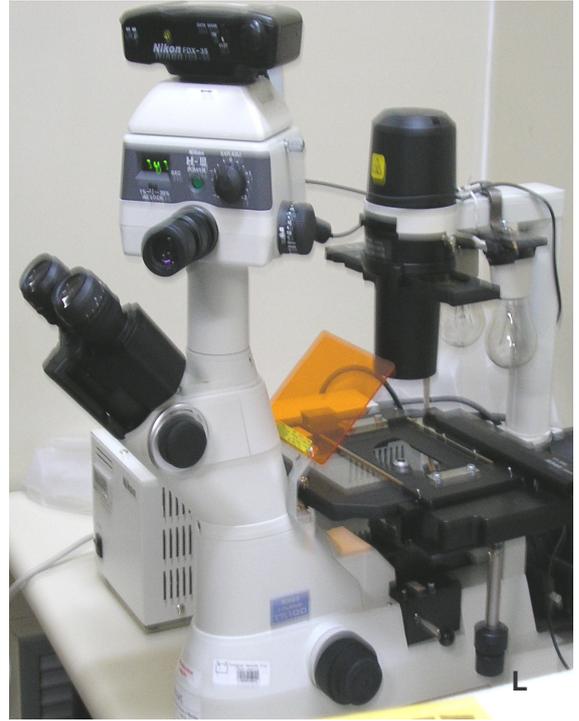


Figura 8 J. Estufa à 37C com CO₂. L. Microscópio Invertido.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade

O vermelho neutro é um corante histológico com características químicas tintoriais neutras às estruturas, que não revelam acidofilia ou basofilia. É um procedimento da sobrevivência/viabilidade celular, baseado na sua capacidade de incorporação e ligação às células viáveis, denominado como um corante supravital. É um cátion de fácil penetração nas membranas, transportado pelo processo de difusão e com acúmulo nos lisossomos intracelulares. As alterações da superfície da célula ou da membrana dos lisossomos tornam-se gradualmente irreversíveis. Tais mudanças causadas pela ação do resultado de irritantes, agem na concentração do corante, e será o indicador na distinção entre células viáveis, danificadas ou mortas. O mecanismo de ação deste teste reflete em uma análise da citotoxicidade na observação de alterações morfológicas celulares. As células, sucessivamente, dividem-se e multiplicam-se durante o tempo em cultura, um produto químico tóxico interferirá nestes processos resultando numa redução da taxa de crescimento, refletida pelo número de células. A citotoxicidade é expressa com uma redução dependente da concentração do vermelho neutro após a exposição química, que fornece assim, um sinal sensível na integridade celular e inibição do crescimento. A maioria dos testes de viabilidade conta com a avaria da integridade da membrana, quando se tornar impermeável, ocorrendo à liberação do corante.

5.2 Mensuração da citotoxicidade / Halo de Inibição

Após 24 h das células semeadas, os poços foram analisados levando-se em consi-

deração a formação do halo claro ao redor dos cimentos, evidenciado assim os danos químicos à monocamada celular, reflexo da citotoxicidade do cimento e da sua capacidade de difusão no gel de agarose. Foram medidos a partir das amostras (tabela 2), sendo divididos em quatro quadrantes padronizados e, fotografados, juntamente com uma régua milimetrada com a finalidade de calibrar objeto/imagem e aferir macroscopicamente os quatro quadrantes com auxílio do Image Tool[®]. Da coleta dos valores resultantes dessa divisão, foi calculada a média do tamanho de cada halo das três amostras de cada cimento e dos Controles Positivos, a partir desses dados, foi possível obter a média geral dos três poços. Os valores informados nos quatro diferentes quadrantes das culturas 1, 2 e 3, que serviram para o cálculo das médias parciais expostas na tabela 3 fornecidas para obtenção de uma média geral, base da análise comparativa de citotoxicidade entre os cimentos.

Grau	Citotoxiicdade	Descrição da Zona de Descoramento
0	ausência	Ausência de descoramento sob a amostra
1	leve	Zona de descoramento limita a área sob a amostra
2	branda	tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,5 cm
3	Moderada	tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,5 e 1,0 cm.
4	Severa	tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

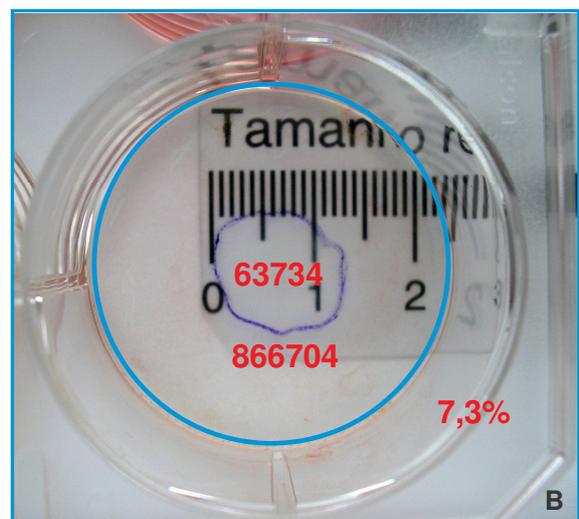
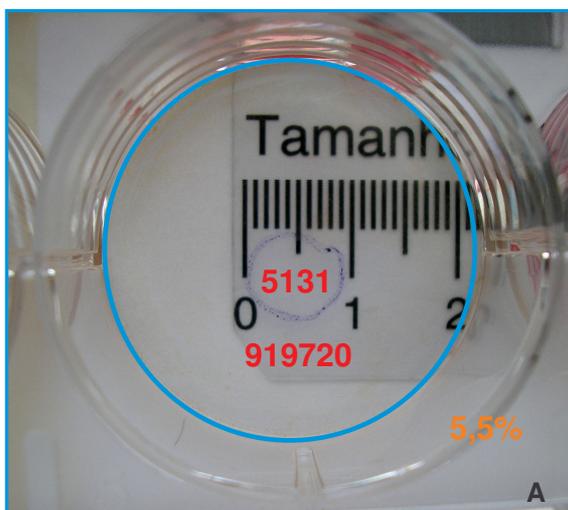
Tabela 2. Grau de Citotoxicidade

Quadrantes Culturas	Grupo I - Acroseal®				Grupo II - AH Plus®				Grupo III - Sealer 26®			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Controle +	0,41	0,47	0,44	0,64	0,43	0,40	0,49	0,44	0,59	0,44	0,59	0,50
	Média = 0,49				Média = 0,44				Média = 0,53			
Cultura 1	0,47	0,48	0,41	0,45	0,39	0,35	0,41	0,36	0,40	0,42	0,47	0,47
	Média = 0,45				Média = 0,38				Média = 0,44			
Cultura 2	0,52	0,53	0,54	0,55	0,38	0,39	0,36	0,37	0,39	0,43	0,46	0,48
	Média = 0,54				Média = 0,38				Média = 0,44			
Cultura 3	0,52	0,57	0,54	0,56	0,38	0,39	0,38	0,40	0,63	0,65	0,62	0,63
	Média = 0,55				Média = 0,39				Média = 0,63			
Média Geral	0,51				0,38				0,5			

Tabela 3. Valores dos quadrantes por culturas em cm

(*Não houve formação de halo de inibição no controle negativo).

Logo após a mensuração dos quadrantes, o meio de cultura foi removido ficando evidenciados nos poços os halos de inibição, que tiveram seus limites demarcados com hidrocor dermatográfico, os quais foram lançados no Image Tool® para obtenção das áreas do poço e do halo de inibição, relacionando percentualmente a área de necrose com a área total do poço, conforme exemplo explicativo (figura 9).



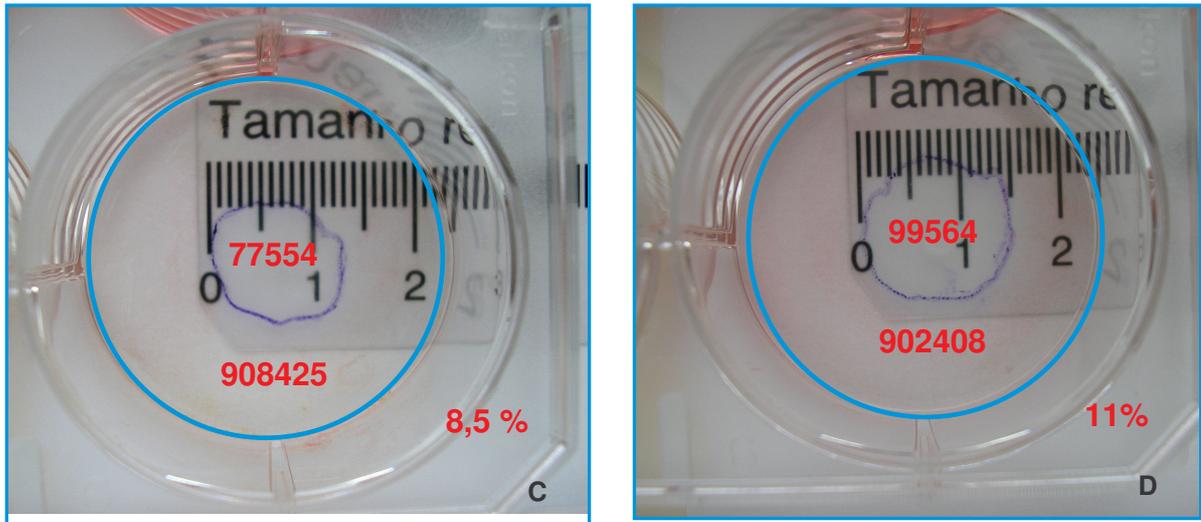


Figura 9. Fotos da Mensuração da área de Necrose do cimento (A) AH Plus[®], (B) Sealer 26[®], (C) Acroseal[®] e (D) C+

5.3 Percentual da Área de Necrose

Cálculo do Poço do Cimento Acroseal[®]:

a) Área Total do Poço em Pixel : 908425

Área de Necrose em Pixel : 77554

$$\begin{array}{r} 908425 \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100\% \\ 77554 \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X \quad = \quad 8,5\% \text{ de necrose celular} \end{array}$$

Cultura	Grupo I Acroseal [®]	Grupo II AH Plus [®]	Grupo III Sealer 26 [®]
Controle	9,5%	7,8%	11%
Cultura 1	8,5 %	5,3%	7,3%
Cultura 2	10,5%	5,5%	7,2%
Cultura 3	12%	5,8%	15%
Média Geral	10,3%	5,5%	9,8 %

Tabela 4. Percentual da área de necrose celular

5.4 Análise Estatística

A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada para comparar a citotoxicidade dos cimentos pesquisados (Acroseal[®] - Grupo I, AH Plus[®]- Grupo II, Sealer 26[®] Grupo III) e o controle positivo (Grupo IV), em relação ao maior halo de inibição em cultura celular L-929. A presença de diferenças de citotoxicidade entre os grupos foi indicada através dos valores de $F=10,67$ e $p=0,00$ (tabela 4), necessitando de complementação do teste Student-Newman-Keuls, usado para comparações múltiplas, afirmando existir diferenças estatísticas entre os Grupo I e II, III e II e IV e II, com nível de significância 5%, conforme tabela 5.

Análise de Variância ANOVA			
Grupo	Nº de dados	Média	Desvio Padrão
I - Acroseal	12	0,51	0,05
II – AH Plus	12	0,38	0,02
III – Sealer 26	12	0,50	0,10
IV - Controle Positivo	12	0,49	0,08
$F = 10,67$ e $P = 0,00$			

Tabela 5. Análise de Variância

Student-Newman-Keuls		
Comparação	Dif. Das Médias	P < 0.05
1 vs 2	0,13	S
1 vs 4	0,02	NS
1 vs 3	0,01	Do not test
3 vs 2	0,12	S
3 vs 4	0,02	Do not test
4 vs 2	0,11	S

Tabela 6. Comparação entre as médias.

Os gráficos deram informações visuais dos resultados estatísticos obtidos da citotoxicidade dos quatro grupos (figuras 10 e 11). A distribuição dos dados de citotoxicidade do grupo II (AH Plus®) apresentou-se de maneira mais uniforme e, concisa do que os grupos I, II e IV.

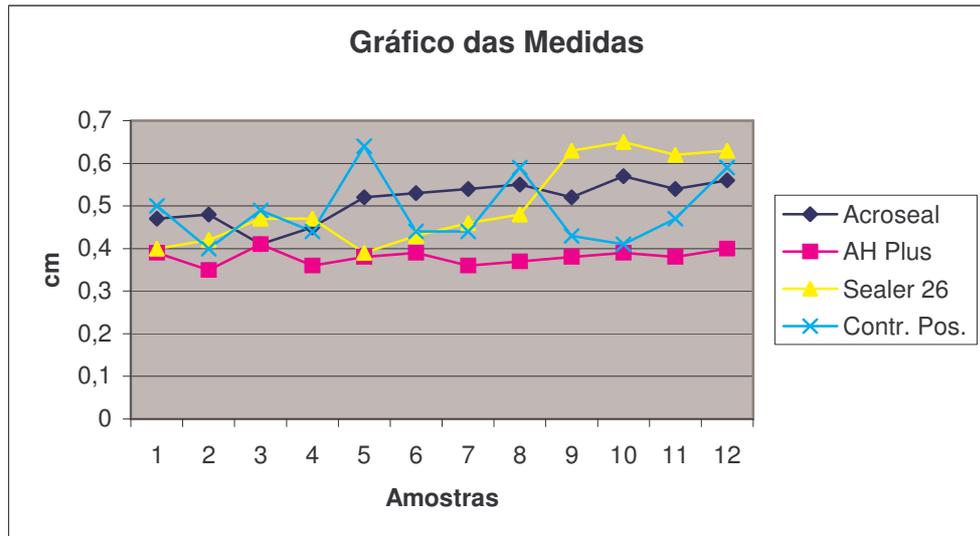


Figura10. Medidas dos Quadrantes em cm

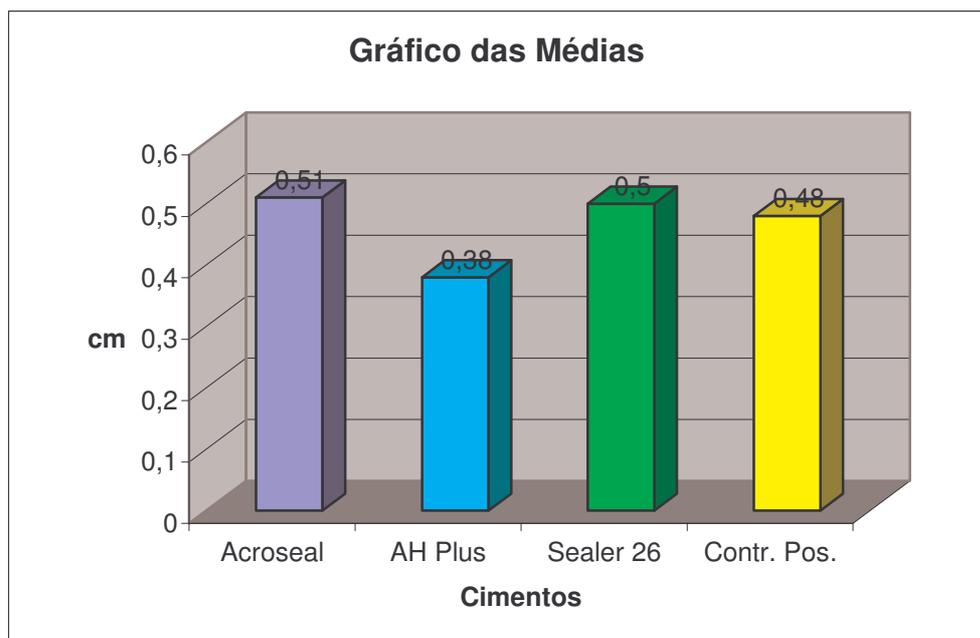


Figura11. Gráfico das Médias dos Quadrantes das Amostras

5.5 Cimento AH Plus®

O grupo II apresentou média geral dos halos de inibição de 0,38 cM (tabela 3 e figura 12), e percentual de necrose de 5,5%. Três zonas foram visualizadas no microscópio, conforme a reatividade do material (figura 13 e tabela 7).

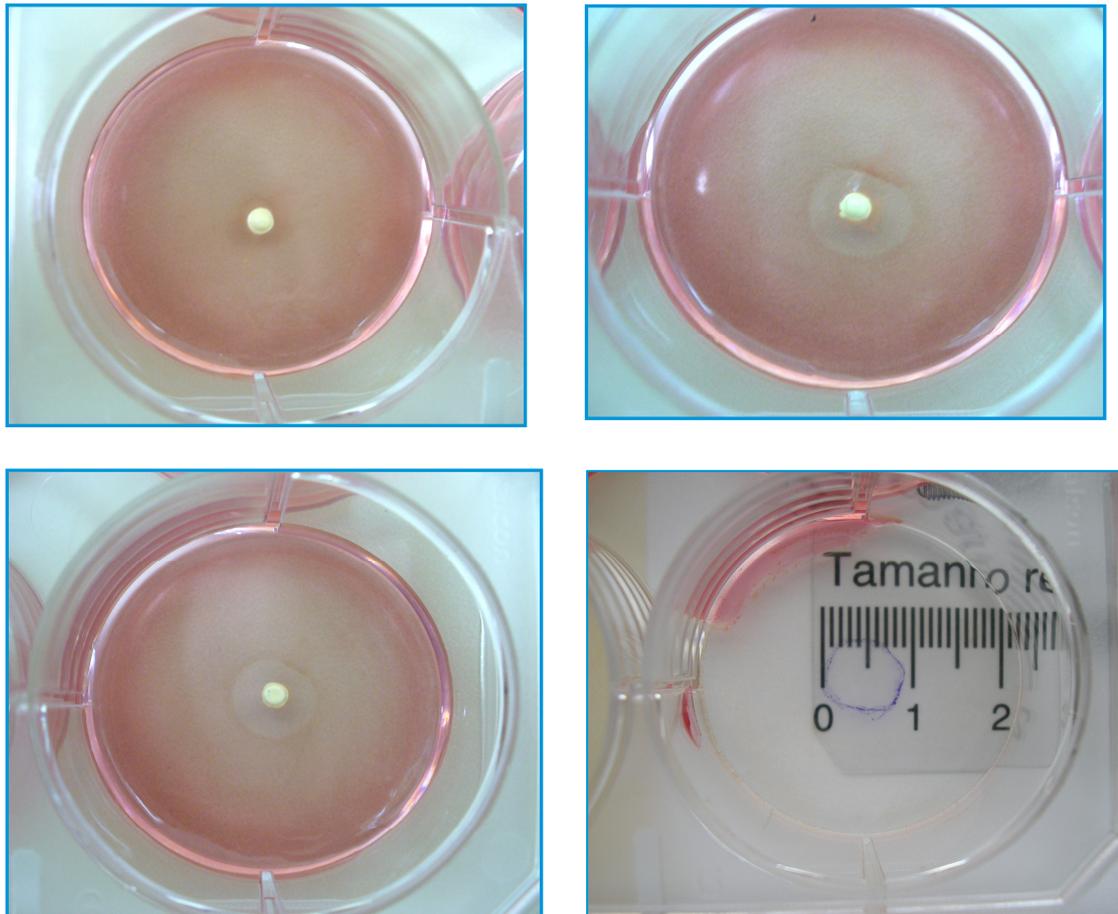


Figura 12. Fotos dos halos de inibição do cimento AH Plus®

AH Plus®	Halo de Inibição	Área de Transição	Área de Viabilidade Celular
	<p>Pequena área livre de células coradas com VN. 5,5% de necrose celular.</p>	<p>Estreita área, pouca rarefação celular e frequência maior de células coradas com VN.</p>	<p>Extensa área de células, coradas com VN, aparentemente mais densa.</p>

Tabela 7. Avaliação Microscópica do cimento AH Plus®

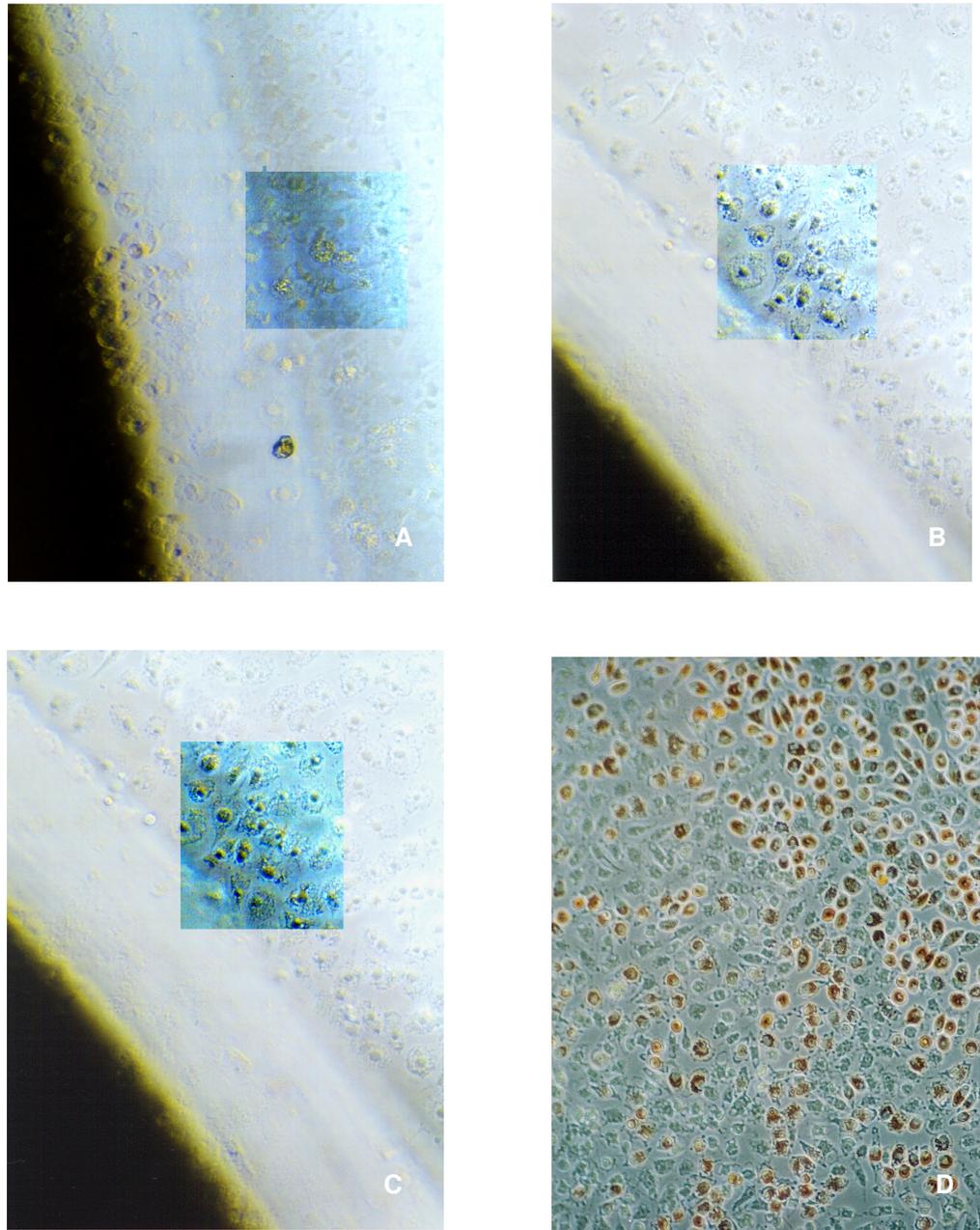


Figura 13. Fotos da linhagem de Células L-929 semeadas com o cimento AH Plus[®] apresentando halos de inibição (A,B e C) 200X. Área de Transição (D) 100X.

5.6 Sealer 26[®]

O grupo III apresentou média geral dos halos de inibição em torno de 0,5 cm (tabela 3, figura 14). Na microscopia foi possível visualizar a resposta celular perante a difusão dos componentes químicos pela distinção de manchamento dos três trechos que estabeleceram a citotoxicidade de forma precisa (figura 15 e tabela 8). A

degradação de fibroblastos foi definida com a média da taxa de necrose de 9,8% (tabela 6).

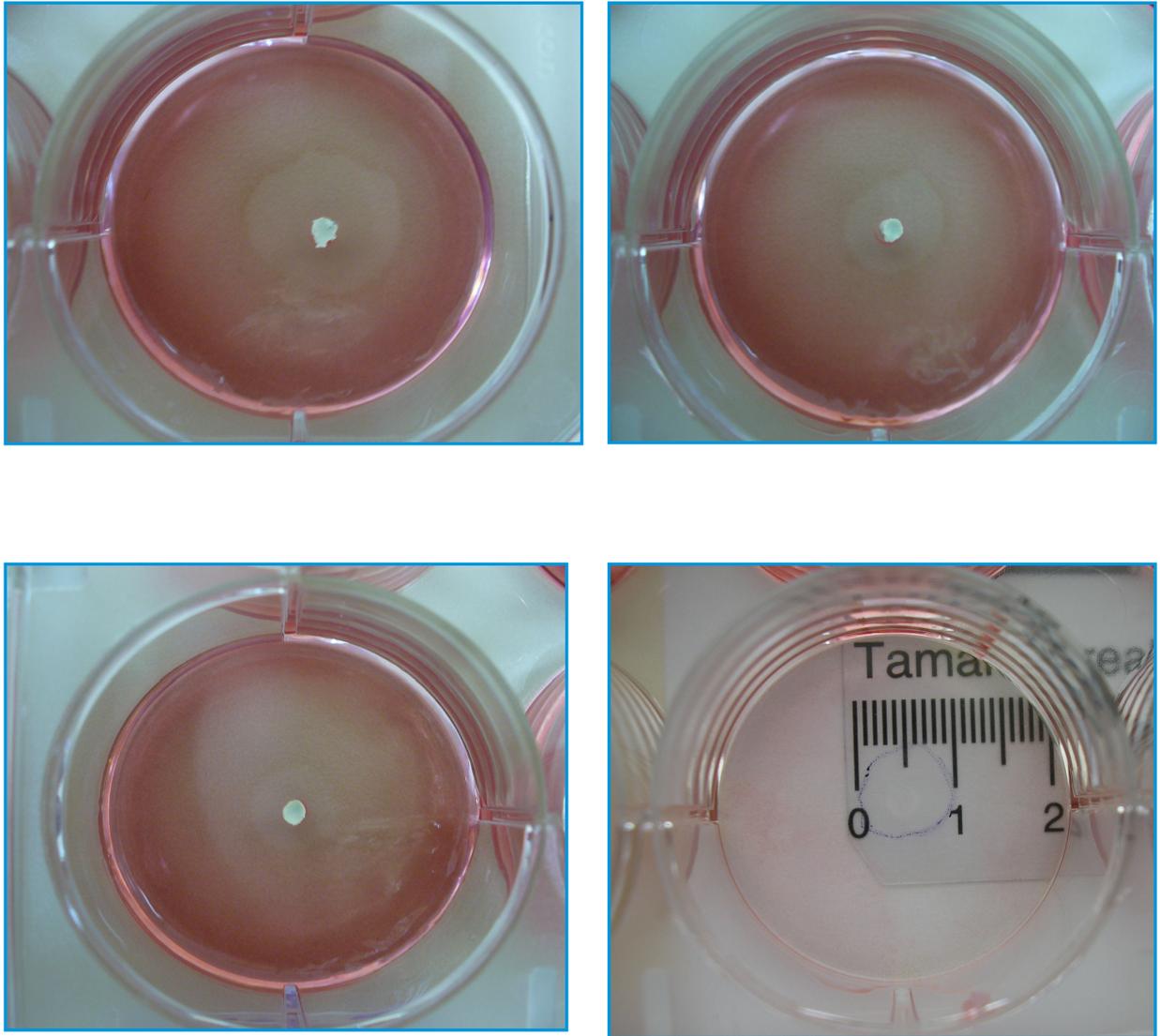


Figura 14. Fotos dos Halos de Inibição do cimento Sealer 26®

Sealer 26®	Halo de Inibição	Área de Transição	Área de Viabilidade Celular
<p>Amostra</p>	<p>Área extensa livre de células coradas com VN. 9,8 % de necrose celular.</p>	<p>Poucas células coradas e, equi distantes entre si. Rarefação celular acentuada</p>	<p>Pequena área de pouca densidade celular corada com VN.</p>

Tabela 8. Avaliação Microscópica do cimento Sealer 26®

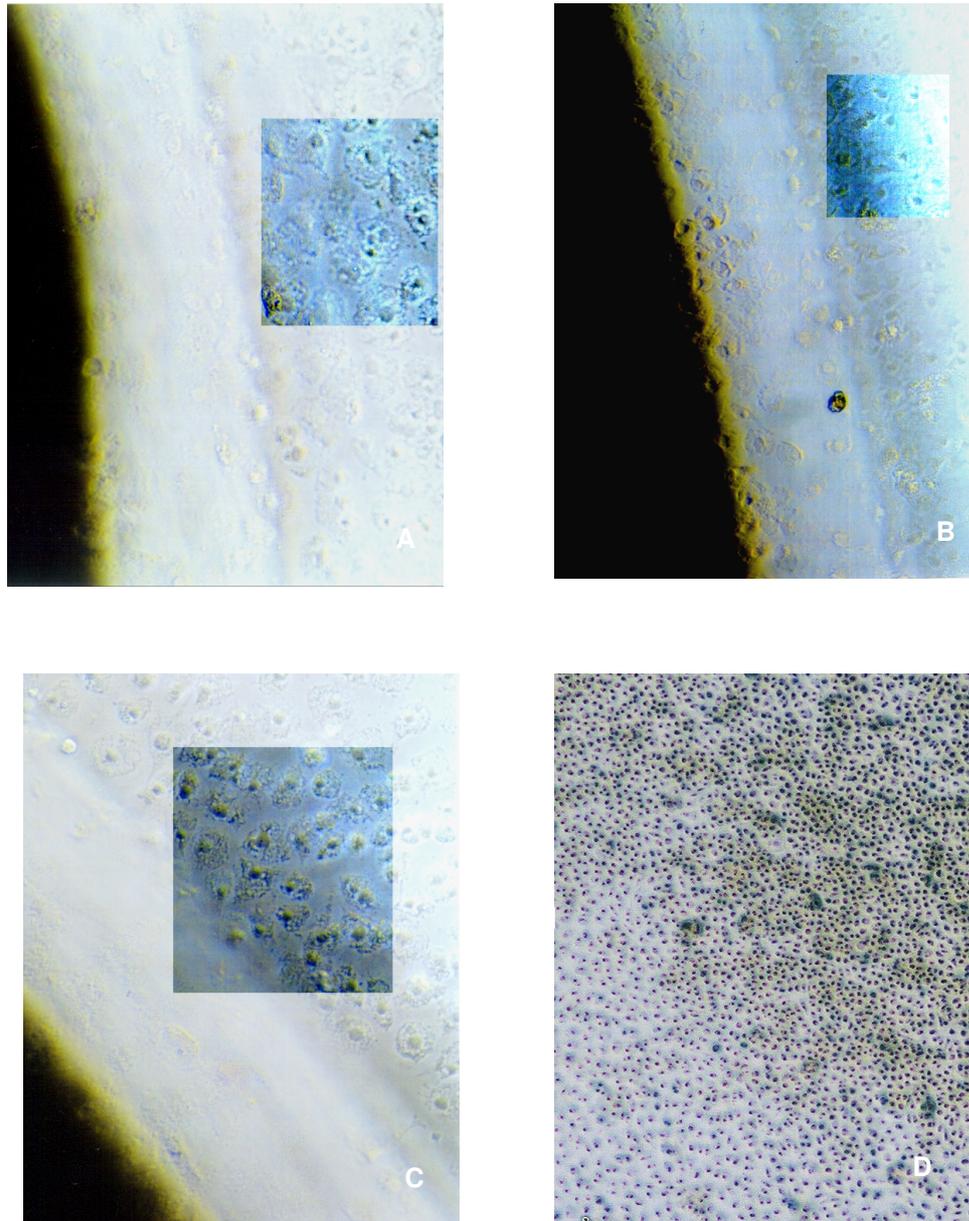


Figura 15. Fotos da linhagem L-929 semeadas com cimento Sealer 26[®] (A, B e C) 200X, apresentando halos de inibição. Área de Transição (D) 40X.

5.7 Cimento Acroseal[®]

Os resultados dos efeitos tóxicos do grupo I foram definidos com halos de inibição extensos em torno de 0,51 cm (tabela 3, 6 e figura 16), e com estabelecimento de uma taxa média de degradação de células L-929 de 10,3%.

Microscopicamente, três áreas tiveram suas demarcações bem definidas, que foram detalhadas na tabela 9 e figura 17.

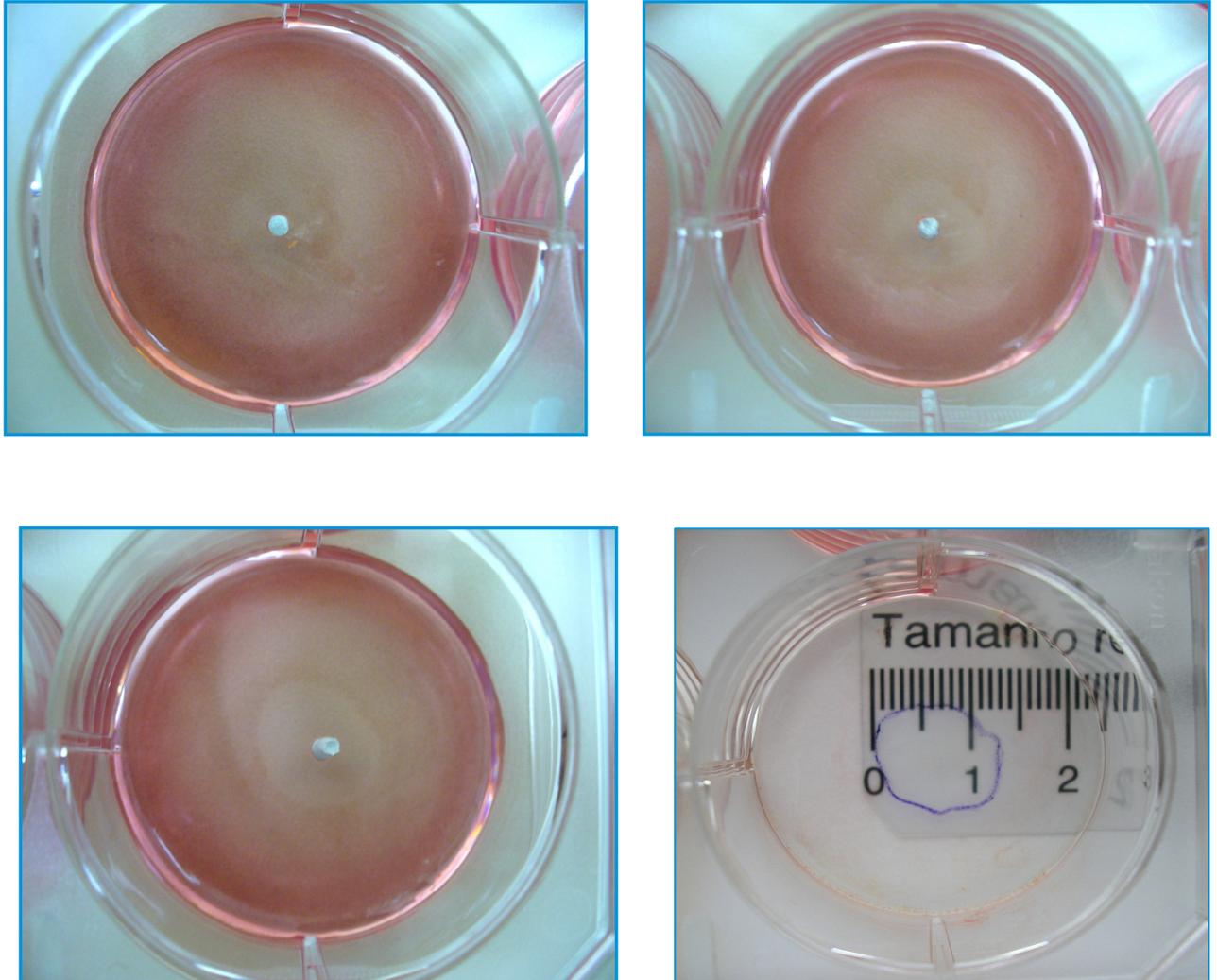


Figura 16. Fotos dos halos de inibição do cimento Acroseal®

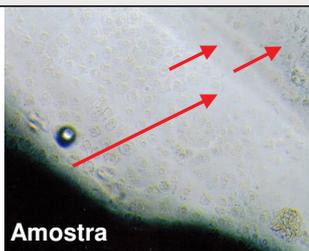
Acroseal®	Halo de Inibição	Área de Transição	Área de Viabilidade Celular
 <p>Amostra</p>	Extensa área livre de células, 10,3% de necrose celular	Rarefação celular, pouca presença de células coradas com VN	Pequeno trecho de pouca densidade celular coradas com VN.

Tabela 9. Avaliação microscópica do cimento Acroseal®

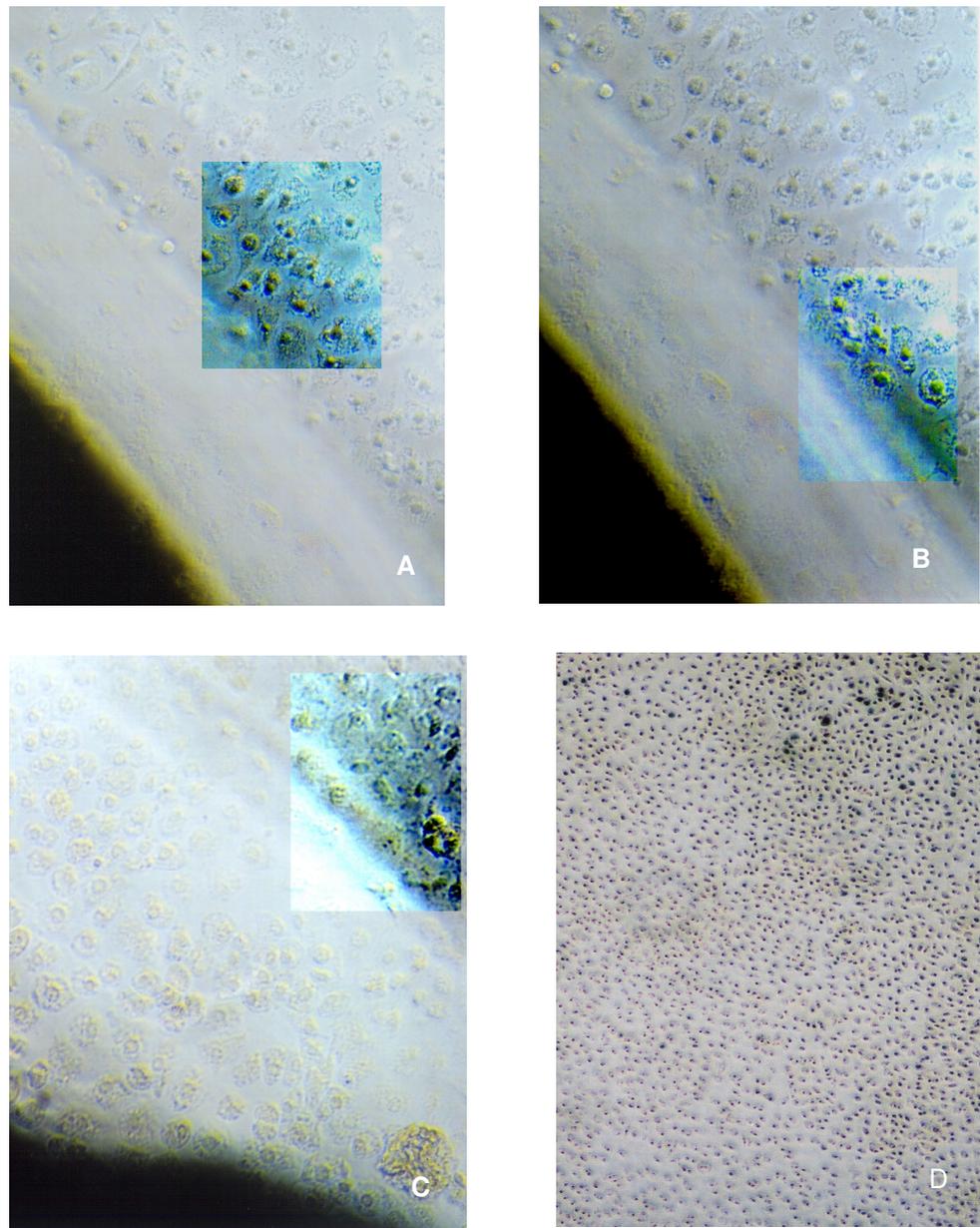


Figura 17. Fotos da linhagem L-929 semeadas com o cimento Acroseal[®] apresentam do halo de inibição 200X (A,B e C). Área de transição 40X (D).

5.8 Dos Controles

O Controle Negativo apresentou ausência de citotoxicidade, confirmada pela aderência de células sob e ao redor do teflon e também constatada no Controle de

Células por meio de uma monocamada celular densamente corada com o corante VN, sugestiva de 100% de células viáveis (figura 18).

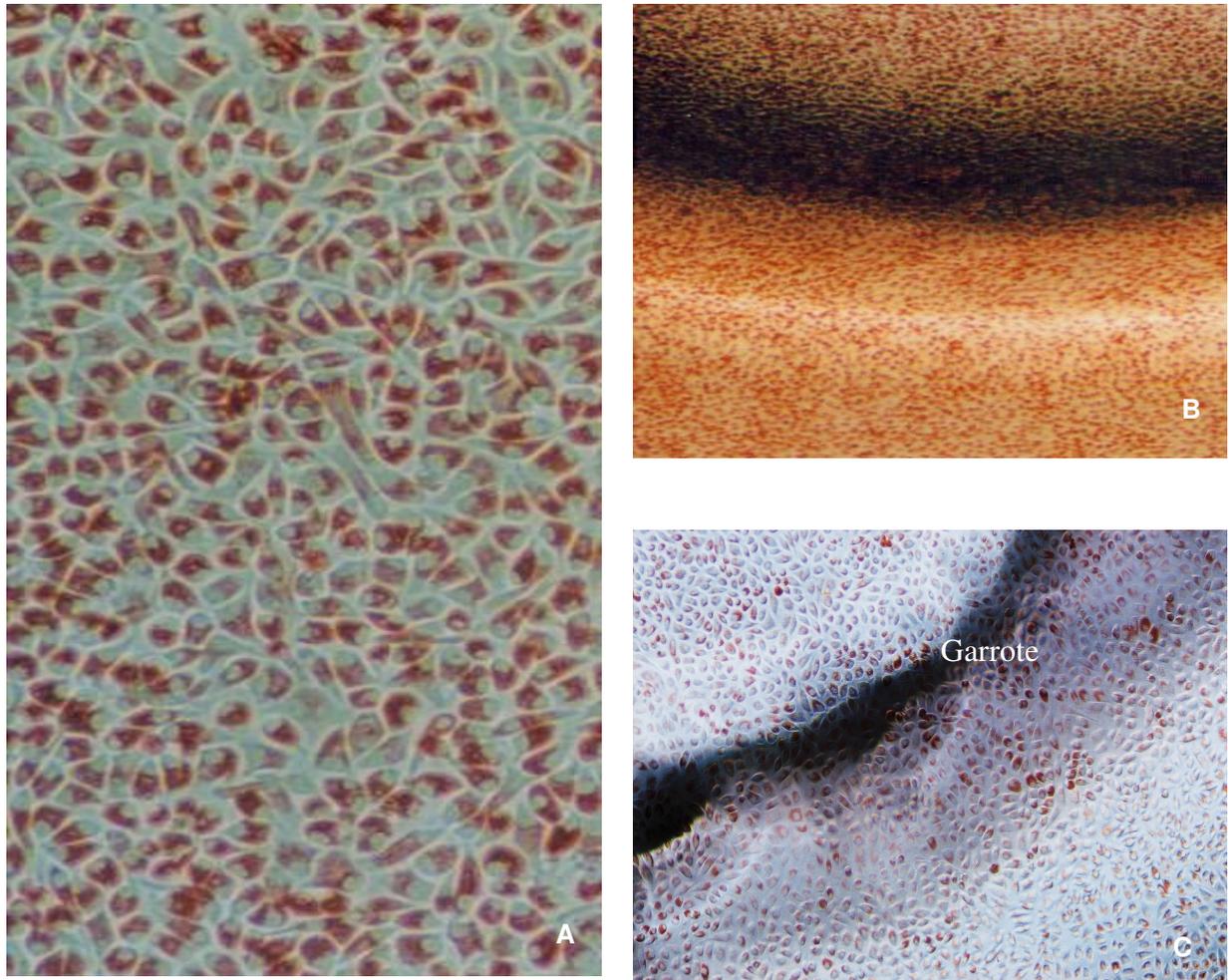


Figura 18. Fotos de fibroblastos L-929 (200X) (A). Controle de Células (B) 40X. Controle Negativo (C) 100X.

A efetivação dos efeitos citotóxicos do Controle Positivo nas células L-929 foram microscopicamente visualizados com extensa degradação de fibroblastos (figura 19), numericamente representados pelas médias geral dos halos de inibição em torno de 0,49 0,44 e 0,53 cM (tabela 3 e 6), que forneceram percentual de necrose celular de 7,8%, 9,5% e 11% respectivamente.

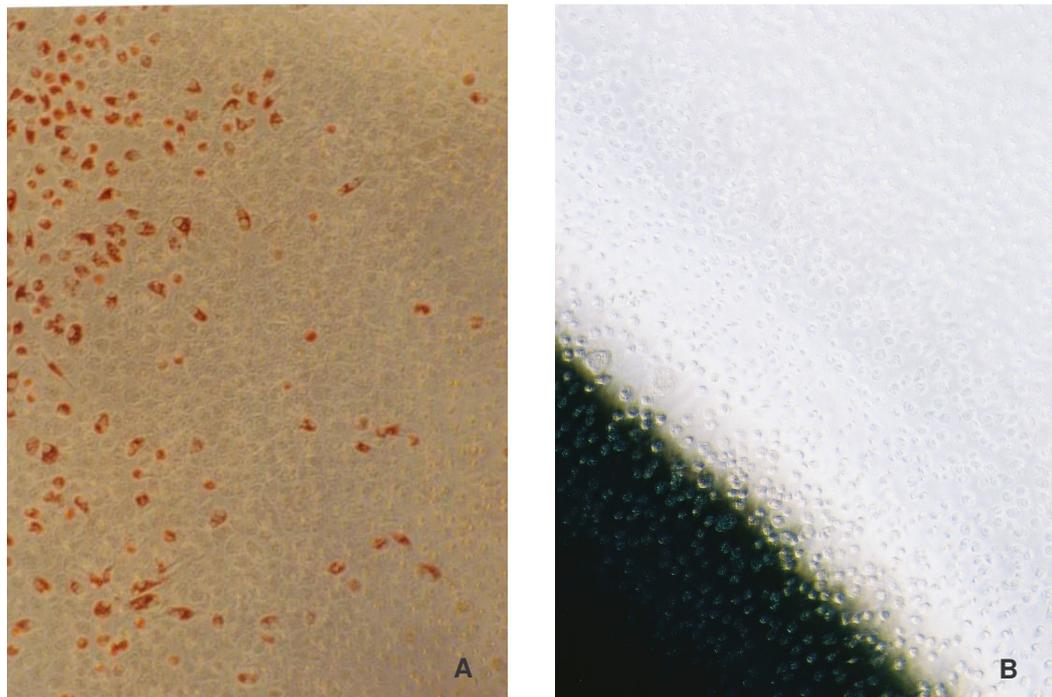


Figura 19. Fotos de fibroblastos L-929 com o Controle Negativo: (A) zona de transição, com rarefação celular. (B) halo de inibição (100X).

Após os resultados obtidos da análise estatística, uma relação comparativa máxima de citotoxicidade pôde listar os cimentos de uso endodôntico na seguinte disposição: Acroseal[®] > Sealer 26[®] > AH Plus[®].

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Das Linhagens de Células

Tecidos normais de animais ou embriões inteiros são geralmente usados para estabelecer a **cultura de células primárias**, dobram-se em 50 a 100 populações, portanto tem crescimento limitado e extensão de vida definida. Em contrapartida, as células derivadas de tumores proliferam-se indefinidamente em cultura, as quais são denominadas **linhagens de células imortais** (FRESHNEY, 2000). As linhagens de células de rim de hamster recém-nascido (BHK 21), fibroblastos de ratos (L-929), HeLa, células epiteliais de carcinoma cervical humano (HeLa), células do rim de macaco (VERO) e células epiteliais (NCTC2544). As células L-929 são heteroplóides evitam as interferências genéticas dando mais consistência aos resultados, se dispõem de forma compacta necessitando de menor concentração de soro. São empregadas rotineiramente em pesquisa laboratoriais na observação dos efeitos toxicológicos dos materiais odontológicos, sendo preconizadas pelas normas ISO 10993-5 e ASTM-STP-810 (KETTERRING e TORABINEJ, 1984; WATAHA, CRAIG e HANKS, 1992; STANLEY, ZIEMIECKI e SPANGBERG, 1993; BELTES et al., 1995; RATANASATHEIN, 1995). Diante dessas características tornaram-nas mais confiáveis para o ensaio de citotoxicidade dessa pesquisa, conforme também nos ensaios experimentais de Beltes et al., 1995; Osório et al., 1998; Saidon et al., 2003; Koulaouzidou et al., 2005. Em oposição temos Arenholt-Bindslev e Hörsted-Bindslev, 1989; Willershausen et al., 2000; Huang, Tai e Chang, 2002 quando utilizaram linhagens primárias em seus ensaios experimentais.

Algumas dificuldades são encontradas na investigação dos testes de citotoxicidade *in vitro*, como as variações das condições experimentais relacionadas

como os tipos de células, método de contato material-célula, tempo de exposição e condição do material, além disso, diferentes tipos de células reagem para o mesmo material com intensidades diferentes, que estabelecem limites na relação comparativa de resultados em cultura de células (YESISLOY e FEIGAL, 1985; AL-NAZHAN e SPANGBERG, 1990; VAJRABHAYA et al., 1997; KOULAOUZIDOU et al., 2005).

6.2 Da Metodologia

O teste de citotoxicidade é o primeiro passo na avaliação da biocompatibilidade, para se obter segurança confiável dos produtos químicos. Isto entretanto, de forma simples, custo baixo, de fácil reprodução limitando o número de variáveis experimentais. Assim a metodologia de difusão em agar com o corante vermelho neutro vêm sendo usada nos testes de reatividade biológica em materiais médicos e hospitalares, como também no setor de cosméticos (GUESS, 1965; ASTM-STP 810; ROGERO, 2000; LÖNNROTH e DAHL, 2003; CARVALHO, 2005). Sua indicação nessa pesquisa deve-se a facilidade, simplicidade de aplicação e de leitura de resultados que são obtidos por meio macroscópico. O campo visual do microscópio utilizado para validar o ensaio de citotoxicidade, na absorção de informações dos eventos das reações celulares diante dos efeitos tóxicos dos cimentos, dos Controles Negativos (figura17) e Positivos (figura 18) nas diferentes áreas da monocamada celular L-929 (área de necrose, de transição e área de viabilidade celular). Entretanto, poucos dados literários científicos estão disponíveis dessa metodologia, no que se refere aos materiais endodônticos. Dispomos assim, de alguns resultados na confirmação da escolha dessa metodologia, conforme Cruz

et al.,1998; o teste de citotoxicidade a ser aplicado, deve ser o mais sensível possível, a fim de detectar as pequenas quantidades de produtos tóxicos que possam estar contidas nos cimentos. Ainda sobre a sensibilidade dessa metodologia, pode-se afirmar por meio da alteração do tamanho dos espécimes dos cimentos para as dimensões de 1mM X 1 mM em relação ao padrão de 1 cM utilizado por Mohammad et al., 1978, ainda foi possível notar a citotoxicidade sobre às células L-929, apesar dessa redução.

Schamlz, 1988, reafirma a validade dessa metodologia, que talvez seja o método de análise de citotoxicidade mais recomendado, visto que durante a sua execução não há necessidade do processamento do produto analisado. Também verificada por Rogero et al., 2003, quando comparam-na à metodologia de extração.

6.3 Dos Resultados dos Cimentos

Conforme os resultados apurados nessa pesquisa com os cimentos Acroseal[®], AH Plus[®] e Sealer 26[®], todos os cimentos levaram a degradação celular em cultura, reflexo da difusão química dos componentes dos cimentos, acorde com Safavi et al., 1989; Granchi et al.,1995; Bratel et al., 1998; Gerosa et al., 1998; Geurtsen et al., 1998; Telli et al., 1999; Miletić et al., 2000; Neff, Layman e Jeansonne, 2002; Öztan et al., 2003; Al-Awadhi et al., 2004 ; Merdad et al., 2007.

6.3.1 Do Cimento AH Plus[®]

O cimento AH Plus[®] é uma nova proposta dos cimentos resinosos, sua fórmula é derivada do cimento AH 26[®] e, segundo seu fabricante há preservação química

desse cimento, mas com isenção do formaldeído. O comportamento biológico desse cimento nessa pesquisa apresentou-se bastante aceitável, indicando uma média geral da área de necrose de 5,5% de ocupação do poço, posicionando-o menos citotóxico que os cimentos Sealer 26[®] e Acroseal[®]. Igualmente aos nossos resultados, temos Mohammad et al. 1978, que apresentaram resultados de riscos biológicos com o uso de cimento à base de resina epóxica em uma pesquisa similar. Em contrapartida, estudos de Cohen et al., 2000, posiciona seus resultados de severa citotoxicidade com 80% de lise de células L-929.

Através de uma coletânea científica, objetivando a apresentação do comportamento biológico do cimento AH Plus[®], observou-se nas mais variadas metodologias e linhagens de células pesquisadas, a exemplo Huang et al. 2002, Hunag, Lii e Kao, 2001, constataram que a infiltração de desidrogenase láctica (LDH), que regula o nível de glutathione (GSH), fator de proteção de danos as células estão diretamente relacionados com as concentrações dos cimentos endodônticos. Confirmamos esses achados nessa pesquisa, uma vez que a mudança no tamanho das amostras expressaram respostas celulares diferenciadas, pois o tamanho de 5 mM do cimento AH Plus[®] apresentou severa reatividade biológica, segundo os parâmetros do Protocolo Operacional Padrão (POP) com 100% de células mortas, desde então foi considerada a necessidade da redução do tamanho da amostra para 1mm, onde a citotoxicidade dos materiais apresentaram-se mais aceitável, sendo avaliados posteriormente por meio de uma relação comparativa de análise estatística dos cimentos pesquisados, de fato essa redução validou o teste de citotoxicidade. Os menores índices de stress oxidativo em hepatócitos de ratos e níveis de GSH de 0,1% foram obtidas com a concentração de 0,10% do cimento AH Plus[®]. De acordo com informações de Huang e Chang (2005), a dieta rica com

suplemento de GSH, tem potencial preventivo nas reações inflamatórias periapicais induzidas pelas resinas epóxicas que corroboram para a citotoxicidade e ativação da COX-2, responsáveis pela síntese de prostaglandinas no sítio da inflamação. Willershausen et al. 2000 confirmaram a alta citotoxicidade desse cimento com níveis de 9.3% na produção de PGE₂ (Prostaglandinas E₂).

Em observação aos padrões citogenéticos e citotóxicos Leyhausen et al., 1999, parecem ter encontrado resultados desprezíveis ou até mesmo ausência destes com a aplicação do extrato desse cimento, assim como Camps e About, 2003; Gahyva e Siqueira Júnior, 2005, quando usaram outras metodologias. Em contrapartida, Schweikl e Schmalz, 2000; Tai, Huang et al., 2001; Bouilaguet et al., 2004; Miletic et al., 2005 comprovaram a citotoxicidade da composição química do cimento AH Plus[®], com resultados altamente significativos com a pasta A e da mistura fresca.

Como sabemos muitos cimentos endodônticos levam a degradação celular em mistura fresca, apesar de apresentarem biocompatibilidade satisfatória, decorrente da finalização da polimerização do material e da liberação de elementos nocivos à cultura de células (GRANCHI et al., 1995; TELLI et al., 1999; HUANG et al., 2000; HUANG et al., 2004). Em nossa pesquisa, os cimentos foram aplicados em cultura celular após 48 h de manipulação, certamente após a ocorrência da polimerização com redução substancial na decomposição do material e da solubilidade em cultura, que ofereceu um desempenho mais satisfatório de citotoxicidade, diferentemente da condição de mistura fresca. A resposta do comportamento biológico desse cimento confirmado por Azar et al., 2000, é representada pelo menor conteúdo solúvel em água de formaldeído, ocorrido da decomposição da amina constituinte da pasta B, acelerador da polimerização, ou até mesmo de outros componentes que puderam contribuir para efeitos adversos locais e sistêmicos, uma vez que a complexidade

química vem favorecer os danos celulares. Concordamos com este fato, pois em análise comparativa do índice de citotoxicidade dos cimentos AH Plus[®], Sealer 26[®] e Acroseal[®], resultados mais aceitáveis foram encontrados com o cimento AH Plus[®], talvez, o constituinte amina da pasta B, ou outros elementos químicos menos solúveis, tenham contribuído para tal. De acordo com as observações de Leonardo, Silva e Tonomaru Filho, 1999, que representaram quantitativamente 10^{-5} mol/L a concentração de formaldeído presente na composição desse cimento, sendo numericamente desprezíveis, segundo os autores. Em contrapartida, os cimentos Sealer 26[®] e Acroseal[®] talvez preservem a mesma química do cimento AH 26[®] com permanência da hexametiltetramina. Tal resultado foi confirmado nos nossos achados, afirmados nas diferenças de resultados entre os cimentos AH Plus[®], Acroseal e Sealer 26[®], sugestivo da permanência da preservação química. Comparativamente, Cohen et al., 2000 dimensionaram as quantidades de formaldeído em 3.9 ppm e 1347 ppm, respectivamente, para os cimentos AH Plus[®] e AH 26[®], responsáveis pela qualidade bactericida e também pelos mecanismos de indução do gene de expressão da Interleucina- 6 e Interleucina- 8, relacionadas com a progressão das lesões periapicais e efeitos deletérios em cultura celular (KOULAOUZIDOU et al., 1998; PULGAR et al., 2002; MILETIĆ et al., 2005).

Essas considerações confirmaram a citotoxicidade dos cimentos de uso endodôntico (MILETIĆ et al., 2003; BOUILLAGUET, 2006; QUEIROZ et al., 2006)

6.3.2 Do Cimento Sealer 26[®]

A necessidade de obter melhores ajustes na composição química do cimento AH 26, Berbet, em 1978, (apud SACOMI) propôs a inclusão de 20% de hidróxido de

cálcio o que contribuiu para melhorar suas propriedades de biocompatibilidade, . As pesquisas propostas ao novo cimento resinoso Sealer 26[®], também foram pesquisadas por Holland et al.,1978. Resultados opostos foram apresentados nos estudos de Nakamura, et al., 1986, quando da incorporação de 20% de hidróxido de cálcio ao cimento AH 26[®], com o aumento de lise celular epitelial. De acordo com os resultados encontrados nessa pesquisa a média geral da área de necrose ocupou 9,9% do poço, confirmados os resultados nas pesquisas de Cohen, et al., 2000; Senne, 2001, diferentemente da análise de Mohammad et al., 1978, com resultados mais favoráveis para o cimento resinoso, quando analisaram alguns cimentos endodônticos.

Parece lícito afirmar que a citotoxicidade mais elevada do cimento Sealer 26[®] direciona-se na preservação da hexametiltetramina em sua fórmula decompondo-se em amônia e formaldeído, não é exatamente o que ocorre na reação química da resina epóxica e amina do cimento AH Plus[®], visto que, sendo menos solúvel, apresentou resultados menos citotóxicos. Certamente, outro constituinte como o epoxibisfenol do cimento Sealer 26, que tem a capacidade de neutralizar os íons de cálcio e a procedente formação de tecido mineralizado, trouxeram prejuízos à resposta celular (SILVA e LEONARDO, 1997). Concordamos com estes resultados na comparação da citotoxicidade dos cimentos Sealer 26[®] e AH Plus[®], ressaltando que o AH Plus[®] não apresenta esse constituinte em sua composição.

Resultados similares foram encontrados na avaliação de Queiroz et al., 2005, que quantificaram as concentrações necessárias para estimulação de óxido nítrico em cultura de macrófagos, com patamares superiores de 0,1 mg/mL e 180 mg/mL em condições letais às células. Os mesmos resultados foram confirmados, com maior amplitude, na produção de óxido de nítrico com o cimento à base de resina

epóxica. Diferentemente, os resultados de Barbosa, Araki e Spangberg, 1993, com a aplicação das metodologias de radiocromo e câmara de inserção, conseguiram resultados bem razoáveis Koulaouzidou *et al.*, 1998, observaram a maior amplitude de citotoxicidade ocorrida em mistura fresca e, nas primeiras horas, devido a incompleta polimerização do material. Vários estudos confirmam essa afirmativa, mas a investigação da citotoxicidade em nossa pesquisa, somente ocorreu após 48h de manipulação, depois do período de polimerização do material.

Gahyva e Siqueira Júnior, 2005, confirmaram a ausência de citotoxicidade e genotoxicidade com o emprego do SOS Chromotest. De acordo com Leonardo et al., 2000, a menor solubilidade desse cimento promoveu os menores halos de citólise em cultura de macrófagos, com apresentação de resultados satisfatórios, comparativamente com o cimento Sealapex[®], decorrente da alcalinidade, fator preponderante na variação da citotoxicidade. Em nossa pesquisa, a área de extensão de lise celular foi maior, confirmando uma maior solubilidade do cimento Sealer 26[®] quando relacionado comparativamente, com o cimento AH Plus[®], colocando-o em condições superiores de citotoxicidade.

Figueiredo et al., 2001, confirmaram a formação de tecido mineralizado na região periapical com o uso do cimento Sealer 26[®], aferindo bom comportamento biológico (HOLLAND et al., 2002; SACOMI et al., 2001). Ainda na análise do comportamento desse cimento, da resposta inflamatória, Valera et al., 2004, observaram em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, os menores índices nos intervalos de avaliação de 14 e 90 dias com esse cimento.

6.3.4 Do Cimento Acroseal®

No âmbito científico, poucos trabalhos foram encontrados sobre o cimento Acroseal®, à base de resina epóxica com hidróxido de cálcio, lançado recentemente no mercado nacional. Vários ensaios de citotoxicidade com cimentos à base de resina epóxica demonstraram injúrias químicas à cultura de células (SPANGBERG, BARBOSA e LAVIGNE, 1993; VAJRABHAYA e SITHISARN, 1997; WILLERSHAUSEN et al., 2000; HUNAG, LII e KAO, 2001; BOUILLAGUET et al., 2004; MERDAD et al., 2007).

Conforme a agressividade tecidual determinada em cultura que dimensionou uma média geral da área de ocupação de 10,3%, podemos afirmar que os riscos biológicos foram maiores com o cimento Acroseal® do que com os cimento AH Plus® e Sealer 26®. Analisando ainda, a Tabela 4 verificamos diferenças insignificantes, todavia na observação individual das culturas, as informações foram mais significativas, visto que as culturas 2 e 3 apresentaram halos de inibição 0,54 e 0,55 cm, correspondem as áreas de necrose de 10,5% e 12% 8,5 % para a cultura 1 com a presença de halo inibição de 0,45 cm, diferentemente do cimento Sealer 26®, onde as culturas 1 e 2 obtiveram halos de inibição de 0,44 cm correspondem aos percentuais de necrose de 7,3% e 7,2 % e 15% para a cultura 3, ratificando assim, maior degradação tecidual do cimento Acroseal®. Divergente aos nossos resultados, Gambarini et al., 2003 encontraram baixos índices de citotoxicidade com o método MTT. Quanto aos riscos biológicos em questão, os cimentos à base de resina epóxica são participantes na ativação da cicloxigenase-2 atribuindo alterações inflamatórias (HUANG e CHANG, 2005).

A checagem da citotoxicidade respeitando os parâmetros do Protocolo Operacional Padrão indicou a alta citotoxicidade dos cimentos pesquisados quando da utilização de amostras de 5cm, os acertos impostos pela reatividade biológica, foram ajustados com a redução da amostra e o tempo de utilização dos cimentos após manipulação de 48 h, que foram necessários para o prosseguimento do ensaio experimental, com coleta de resultados comparativos de citotoxicidade dos cimentos AH Plus[®], Acroseal[®] e Sealer 26[®] obtidos através da Análise Estatística.

A inabilidade de reprodução dos efeitos farmacogenéticos das drogas quando na aplicação dos testes *in vitro*, ainda é um desafio da ciência a ser vencido. As medidas de toxicidade são geralmente eventos celulares, pois apresentam apenas a resposta isolada de um grupo de células, portanto a dinâmica dos tecidos não é reproduzida, tornando indisponível o conhecimento da atuação da concentração da droga, penetração tecidual, metabolismo e excreção. Muitas substâncias depois de metabolizadas no fígado podem apresentar toxicidade, mas *in vitro* podem se tornar atóxicas depois do metabolismo celular. As limitações das informações sobre os materiais servem como margem de segurança no emprego, destes na clínica odontológica.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, parece-nos lícito concluir que:

- Todos os cimentos pesquisados, Acroseal[®], AH Plus[®] e Sealer 26[®] apresentaram citotoxicidade.
- O cimento AH Plus[®], apresentou-se menos citotóxico seguido pelo cimento Sealer 26[®] e Acroseal[®].

Novas pesquisas no campo da toxicologia devem ser realizadas, para que se constatem, efetivamente, os resultados obtidos nos estudos já realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Addendum to American National Standards Institute American Dental Association Document nº 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials, New York, American Standards Institute, 10-6: 1982.
2. AL- AWADHI, S., et al. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. **Journal of Endodontics**, vol. 30, nº 7, p. 527-533, 2004
3. AL-NAZHAN, S.; SPANGBERG, L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material; an electron microscopic study on human ligament fibroblast and L-929 cells. **Journal of Endodontics**, vol.16, nº3, p.129-133, 1990.
4. ARAKI, K.; SUDA, H.; SPANGBERG, L.S.W. Indirect Longitudinal Cytotoxicity of Root Canal Sealers on L-929 Cells and Human Periodontal ligament Fibroblasts. **Journal of Endodontics**, vol. 20, nº 2, p. 67-70, 1994.
5. ARENOLTH-BINDSLEV, D.; HÖRSTED-BINDSLEV, P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. **Endod. Dent. Traumatol.** Vol.5, p. 219-226, 1989.
6. AZAR, N.G., et al. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **Journal of Endodontics**, vol. 26, nº 8, p.462-465, 2000.
7. BARBOSA, S.V.; ARAKI, K.; SPANGBERG, L.S.W. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 75, nº 3, p. 357-361, 1993.
8. BELTES, P., et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. **Endod. Dent. Traumatol.**, vol.11, p. 245-249, 1995.
9. BELTES, P., et al. In vitro Evaluation of the cytotoxicity of two Glass-Ionomer root canal sealers. **Journal of endodontics**, vol. 23, nº 9, p. 572-574, 1997.
10. BOUILLAGUET, S., et al. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontics sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. **European Journal Oral Science**, vol. 112, p. 182-187, 2004.
11. BOUILLAGUETT, S., et al. Initial in vitro Biological Response to Contemporary Endodontic Sealers. **Journal of Endodontics** , vol. 32, nº 10, p. 989-992, 2006.
12. BRATEL, J., et al. Effects of root canal sealers on immunocompetent cells in vitro and in vivo **International Endodontics Journal**, vol. 31, p. 178-188, 1998.
13. CAMPS, J.; ABOUT, I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers; A new method. **Journal of Endodontics**, vol. 29, nº 9, p. 583-586, 2003.

14. CARVALHO, M. A. A. **Citotoxicidade de Três Cimentos Obturadores do Sistema de Canais Radiculares sobre Culturas de Células L-929**. 86 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia do Estado do Rio de Janeiro, 2005.
15. **Cell Culture Test Methods. ASTM-STP 810 S.A.** Brown ed. American Society for testing and materials, 1983.
16. CHOEN, B.I., et al. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. **Journal of endodônticos**, vol. 26, nº 4, p. 228-229, 2000.
17. CRUZ, A.S., et al. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 47 (1/2): 51-57, 1987.
18. CRUZ, A.S., et al. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade "in vitro" de materiais biocompatíveis. **Rev. Saúde Pública**, vol.32, nº2, p. 153-159, 1998.
19. FIDEL, R. S .A. **Estudo das propriedades físico-químicas de alguns cimentos obturadores dos canais radiculares contendo hidróxido de cálcio**. Tese (Doutorado) 194 p. Ribeirão Preto, 1993.
20. FIGUEIREDO, J.A.P., et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **International Endodontic Journal** , 34, p. 377-385, 2001.
21. FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. 4^a ed. Nova York: Ed: Willey-Liss. 2000. 271p.
22. GAHYA, S. M. M.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Direct Genotoxicity and Mutagenicity of Endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems. **Journal Appl Oral Sci.**, vol. 13, nº 4, p. 387-92, 2005.
23. GAMBARINI, G., et al. Cytotoxicity of a new endodontic filling material 11 th Bienal Congress of the European Society of Endodontology, October 2-4, Athens, Greece, 2003.
24. GEROSA, R., et al. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. **Journal of Endodontics**, vol. 21, nº 9, p. 446-450, 1995.
25. GEURTSSEN, W., et. al. Cytotoxicity of root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. **Oral Sugery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 85, nº 5, p. 592-597, 1998.
26. GRANCHI, D., et al. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultures osteoblasts. **Oral Sugery Oral Medicine Oral Pathology**, vol .79, nº3, p. 359-366, 1995.
27. GROSSMAN, L.I. **Tratamento dos canais radiculares**, Rio de Janeiro. Atheneu, 1956.

28. GUESS, W.L., et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, 54: p. 1545-1547, 1965.
29. GUTTUSO, J.; BÚFFALO, N.Y. Histopathologic Study of rat connective tissue reponses to endodontic materials. **Oral Sugery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 16, nº 6, p.713-727, 1963.
30. HOLLAND, R., et al. Effect of the dressing in root canal treatment with calcium hydroxide. **Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, vol. 7, p. 39-45, 1978.
31. HOLLAND, R; SOUZA, V.; NERY, M.J. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hidroxide-containing sealers. **Journal of Endodontics**, vol.28, nº 3, p. 173-176, 2002.
32. HUANG, FM, et al. Citotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. _ **International Endodontic Journal** _ vol. 35, p. 153-158, 2002.
33. HUANG, F; TSAI, C. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. **Journal of Endodontics**, vol.31, nº 9, p. 679-683, 2005.
34. HUANG, TH,. et al. Lactate dehydrogenase leakage of hepatocytes with AH 26 and AH Plus sealer treatments. **Journal of Endodontics**, vol. 26, nº 9 , p. 509-511, 2000.
35. HUANG, TH., et al. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. **Journal of materials Science materials Medicine**, vol. 15, p. 767-771, 2004.
36. HUANG, FM; CHANG,YC. Prevention of the epoxy resin-based root canal sealers-induced cyclooxygenase-2 expression and cytotoxicity of human osteoblastic cells by various antioxidants. **Biomaterials**, vol. 26, p. 1849-1855, 2005.
37. HUNAG, HT; LII, CK; KAO, CT Root Canal Sealers cause cytotoxicity and oxidative damage in hepatocytes. **Journal Biomed Mater Res.**, vol. 54, p. 390-395, 2001.
38. INGLE, J.I. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. **Oral Sugery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 14, p.83-91, 1961.
39. **International Organization for Standartization, ISO 10993**: Part 5. Biological Testing of Medical and dental materials and Devices-Tests for Cytotoxicity In Vitro Methods. Geneve, 1996.
40. KETTERRING, K.; TORABINEJ, A.D.M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and Fibroblasts. **International Endodontics Journal**, vol., p. 60-6, 1984.

41. KOULAOUZIDOU, E. A. et al. Antiproliferative Effect of Mineral Trioxide Aggregate, Zinc Oxide-Eugenol Cement, and Glass-Ionomer Cement Against Three Fibroblastic Cell Lines. **Journal of Endodontics**, vol. 31, nº 1, p. 44-46, 2005.
42. KOULAOUZIDOU, F.A. et al. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. **Endod. Dent. Traumatol.**, vol. 14, p. 182-185, 1998.
43. LAGENLAND, L.K. et al. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials _ **Oral Sugery Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endo**, vol. 27, nº 3, p. 522- 542, 1969.
44. LEONARDO, R.M.; SILVA, L. A.; TONOMARU FILHO, M. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. **Oral Sugery Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod**, vol. 8, nº 2, p. 221-225, 1999.
45. LEONARDO, R.M. et al. Evaluation of cell culture cytotoxicity of 5 root canal sealers: release of hydrogen peroxide **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, vol.3, nº1, p. 7-11, 2000.
46. LEYHAUSEN, G. et al. Genotoxicity and Cytotoxicity of the Epoxy Resin-Based Root Canal Sealer AH Plus. **Journal of Endodontics**, vol. 25, nº 2, p.109-113, 1999.
47. LÖNNROTH, EC; DAHL, J. E. Citotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontol. Scand.**, vol. 61, p. 52-56, 2003.
48. MERDAD, et al. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact Millipore filter assays. **Journal Endodontics**, vol. 33, p. 24-27, 2007.
49. MILETIC, I. et al. Cytotoxic effect of four root filling materials. **Dental Traumatology**, vol. 16, p. 287-290, 2000.
50. MILETIC, I., et al. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH 26 and AH Plus sealers. **International Endodontic Journal**, vol. 36, p. 330-335, 2003.
51. MILETIC, I., et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. **Journal of Endodontics**, vol. 31, nº 4, p. 307-309, 2005.
52. MOHAMMAD, A.R., et al. Cytotoxicidade evaluation of root canal sealers by the tissue culture agar overlay technique. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 45, nº 5, p. 768-773, 1978.
53. MOLLOY, D., et al. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 73, p.490-493, 1992.
54. NAKAMURA, H. et al. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. **Journal of Endodontics**, vol. 12, nº 4, p. 156-160, 1986.

55. NEFF, T.; LAYMAN, D; JEANSONNE, B.G. In vitro cytotoxicity evaluation of endodontic sealers exposed to heat before assay. **Journal of endodônticos**, Vol. 28, nº 12, 2002.
56. OSÓRIO, R.M., et al. Cytotoxicity of endodontics materials. **Journal of endodontics**, Vol. 24, nº 2, 1998.
57. ÖZTAN, D., et al. A comparasion of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. **Journal of Oral Rehabilitation**, vol. 30, p. 426-429, 2003.
58. PULGAR, R., et.al. The effects of AH 26 and AH Plus on MCF-7 breast cancer cell proliferation in vitro. **International Endodontic Journal**, vol. 35, p. 551-556, 2002.
59. QUEIROZ, S., et al. Evaluation of citotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. **Journal of Apllied Oral Science**, vol. 13, nº 3, p. 1-10, 2005.
60. QUEIROZ, C.E.S., et al. Indução da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos pelos cimentos endodônticos Sealapex e Topseal. **Sitientibus, Feira de Santana**, nº 34, p. 145-156, jan/jun., 2006.
61. RAPPAPORT, H. M. Toxicity of endodontic filling materials. **Oral Sugery Oral Pathology Oral Medicine**, vol. 18, nº 6, p.785-802, 1964.
62. RATANASATHEI, S. cytotoxicity interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **J. Dent. Res.**, vol. 4, nº 9, p. 1602-1606, 1995.
63. ROGERO, S.O., et al. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizantes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, vol. 59, p. 1-5, 2000.
64. ROGERO, S.O., et al.. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Research**, vol. 6, nº 3, p. 1-8, 2003.
65. SACOMI, G.R.R., et al. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães após a obturação de canal com os cimentos Sealer 26 e Sealer 26 modificado. **Jornal Brasileiro de Endo/Perio**, vol.2, p.145-152, 2001.
66. SAFAVI, K.E., et al. An in vitro for longitudinal of toxicity of endodônticos sealers. **Journal of Endodontics**, Vol. 15, nº 10, p. 484-486, 1989.
67. SAIDON, J., et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Sugery Oral Medicine oral Pathology**, vol. 95, nº 4, p. 483-489, 2003.
68. SCHMALZ, G. Agar method. **International Endodontic Journal**, vol. 21, p. 59-66, 1988.
69. SCHWARZE, T.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **Journal of Endodontics**, vol. 28, nº 11, p. 784-786, 2002.

70. SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. **Biomaterials**, nº 21, p. 939-944, 2000.
71. SENNE, M.I.A. **Estudo comparativo da citotoxicidade de três cimentos obturadores do sistema de canais radiculares sobre cultura de células vero C1008**. 104 p. Tese (Mestrado). Faculdade de Odontologia da Universidade do Rio de Janeiro, 2001.
72. SILVA, L.A.B.; LEONARDO, M.R. Calcium Hydroxide root canal sealers : evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. **International Endodontic Journal**, vol. 30, p. 205-209, 1997.
73. SPANGBERG, L.; FARMINGTON, C. kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. **Oral Surgery Oral medicine Oral Pathology**, vol. 35, p.389-401, 1973.
74. SPANGBERG, L.S.W.; BARBOSA, S.V.; LAVIGNE, G.D. AH 26 releases Formaldehyde. **Journal of Endodontics**, vol.19, nº 12, p. 596-598, 1993.
75. SPANGBERG, L.S.W., et al. Instruments, Materials, and devices. In: COHEN S., Burns R.C. **Pathways of the pulp**. 7ª ed., St Louis: Mosby, 1998.
76. STANLEY, L.W.JR.; ZIEMIECKI, L.T.; SPANGBERG, L.S. Indirect cytotoxic evaluation of dental materials. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, vol. 75, nº 3, p. 353-356, 1993.
77. STRANGEWAYS, T.S.P. ; FELL, H.B. Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vivo. The development of the undifferentiated limb-bud (a) when subcutaneously grafted into the post-embryonic chick and (b) when cultivated in vitro. **Proc R Soc Lond Biol Sci** vol. 99, p. 340-366, 1926.
78. TAI, KW; HUANG, FM, CHANG, YC. Cytotoxicity evaluation of root canal filling materials on primary oral fibroblasts cultures and a permanent hamster cell line. **Journal of Endodontics**, vol. 27, nº 9, p. 571-573, 2001.
79. TELLI, C., et al. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. **Journal of endodontics**, vol. 25, nº 12, p. 811- 813, 1999.
80. TORNECK, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, vol.24, nº 5, p.674-683, 1967.
81. UNITED STATES PHARMACOPEIA, Rockville, Twinbrook, Parkway, vol. 23, p. 19697-1699, 1995.
82. VAJRABHAYA, L.; SITHISARN, P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. **International Endodontic Journal**, vol. 30, p.141-144, 1997.

83. VAJRABHAYA, L., et al. Comparison between Sulphorhodamine-B dye staining and Cr⁵¹ release method in cytotoxicity assay of endodontics sealers. **Journal of Endodontics**, vol. 23, nº 6, p. 355-357, 1997.
84. VALERA, M., et al. Biocompatibilidade de alguns tipos de cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio e cimentos de ionômero de vidro **Journal of Applied Oral Science**, vol. 12, nº 3, p. 1-10, 2004.
85. VERSIANI M.A., et al. A comparative study of physicochemical properties of AH PlusTM and EpiphanyTM root canal sealants. **International Endodontic Journal**, vol. 39, p. 464-471, 2006.
87. WATAHA, J.C.; CRAIG, R.G.; HANKS, C.T. Precision of new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent. Mat.*, vol. 8, nº 1, p. 65-71, 1992.
88. WILLERSHAUSEN, B., et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. **Journal of Endodontics**, vol. 26, nº 12, p. 703-707, 2000.
89. YESILSOY, C.; FEIGAL, R.J. Effects of Endodontic Materials on Cell viability Across Standard Pore Size Filters. **Journal of Endodontics**, vol. 11, nº 9, p. 401-407, 1985.