



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Maria Isabel Almeida de Senne

**Avaliação da citotoxicidade do BC Sealer, MTA Fillapex e AH Plus e
o efeito no balanço OPG/RANKL em osteoblastos humanos**

Rio de Janeiro

2012

Maria Isabel Almeida de Senne

Avaliação da citotoxicidade do BC Sealer, MTA Fillapex e AH Plus e efeito no balanço OPG/RANKL em osteoblastos humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadores : Prof. Dr. Rivail Antonio Sergio Fidel

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

S478 Senne, Maria Isabel Almeida de.
Avaliação da citotoxicidade do BC Sealer, MTA Fillapex e AH Plus e efeito no balanço OPG/RANKL em osteoblastos humanos / Maria Isabel Almeida de Senne. – 2012.
75 f.

Orientadores: Jose Mauro Granjeiro; Rivail Antonio Sergio Fidel.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Cimentos dentários - Toxicologia. 2. Citotoxicidade de mediação celular. 3. Células - Cultura e meios de cultura. 4. Osteoblastos. I. Granjeiro, Jose Mauro. II. Fidel, Rivail Antonio Sergio. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Bibliotecária Diana Amado Baptista dos Santos/ CRB7 6171

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Maria Isabel Almeida de Senne

Avaliação da citotoxicidade do BC Sealer, MTA Fillapex e AH Plus e efeito no balanço OPG/RANKL em osteoblastos humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovada em 23 de outubro de 2012.

Orientadores:

Prof. Dr. Rivail Antônio Sérgio Fidel
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Sandra Rivera Fidel
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dra. Adriana Brandão Ribeiro Linhares
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe Maria do Céu pelo dom da vida e do amor.

Ao meu querido amor Roberto Guarnier por toda dedicação e companheirismo.

Aos meus filhos João Pedro e Maria Clara pelo curso intensivo de aprender a amar além de nós mesmos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fazer acreditar que a determinação pode nos proporcionar uma vida de vitórias.

A minha família pelo exemplo de amor e carinho.

Aos queridos professores doutores Rivail e Sandra Fidel pela oportunidade, seriedade e verdadeiros exemplos de dedicação a carreira do magistério, sempre cuidando com muito zelo dos seus alunos.

Aos professores doutores Mauro Granjeiro, Adriana Linhares, Gutemberg Alves e a mestranda Juliana por abrirem as portas da Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal Fluminense (UPC/UFF) e ainda terem proporcionado um singular conhecimento científico com incansável dedicação durante toda fase experimental desse trabalho.

Ao professor doutor Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto por ter trilhado meu caminho até a equipe UPC/UFF.

Aos funcionários da UPC/UFF pela solidariedade e em especial ao farmacêutico Santiago Bertoni pelo conhecimento e apoio na parte de metodologia com o Luminex[®].

À professora doutora Luciana Sassone por todo seu incentivo nessa jornada.

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas em nome da professora doutora Elena Mavropoulos Oliveira Tude, pelo apoio na pesquisa da fluorescência.

Aos funcionários da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em especial ao Sr. Angelus e Sra. Denise por toda presteza,

Aos amigos de doutorado e mestrado que convivem, dividem e se solidarizam com todos os obstáculos que surgem até chegarmos a essa defesa.

A todos os professores da Universidade Iguazu (UNIG), por serem amigos e companheiros durante meus 17 anos dedicados à Instituição de Ensino, em especial a professora doutora. Marília Heffer Cantisano que norteou, incentivou e sempre acreditou no meu potencial didático.

As minhas amigas “irmãs” Marta e Simone Mazza, Rita Machado que acompanharam, com muito carinho, essa obra.

À querida amiga Silvia Stile e sua família por compartilharem seus momentos me ajudando em muitas etapas desse trabalho.

RESUMO

SENNE, Maria Isabel Almeida de. **Avaliação do BC Sealer, MTA Fillapex e AH Plus na citotoxicidade e no balanço OPG/RANKL em osteoblastos humanos.**

2012. 75 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar, *in vitro*, a influência de duas novas formulações de cimentos endodônticos: BC Sealer (Brasseler, Estados Unidos da América) e MTA Fillapex (Angelus, Brasil) e do cimento AH Plus (Dentsply, Alemanha) quanto a citotoxicidade em cultura de células humanas e o efeito desses no balanço RANKL/OPG. A partir de fragmentos ósseos descartados pós cirurgias ortopédicas em indivíduos saudáveis, osteoblastos humanos foram cultivados em laboratório e, após confluência, permaneceram expostos ao extratos dos cimentos endurecidos e logo após a manipulação por 24h. Um grupo exposto ao látex e um grupo de células expostas apenas ao meio de cultura serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. Para avaliar os efeitos desses cimentos na viabilidade e morfologia de osteoblastos foram empregadas cinco metodologias: teste multiparamétrico para ensaio de citotoxicidade avaliando função mitocondrial (XTT), integridade da membrana (vermelho neutro) e proliferação celular (cristal violeta); teste IC_{50} ; microscopia eletrônica de varredura; microscopia de fluorescência para identificar células vitais e citometria de fluxo com a tecnologia do Luminex[®] utilizando dois painéis humanos que envolvem a osteoclastogênese. Após análises estatísticas, qualitativas e morfológicas, os resultados revelaram que, comparado aos controles, o cimento AH Plus foi citotóxico logo após a manipulação ($p < 0,05$), mas semelhante ao controle negativo quando empregado após o endurecimento. O cimento MTA Fillapex foi citotóxico tanto fresco como após a presa, entretanto, na análise do índice de diluição (IC_{50}), sua toxicidade foi diminuída a partir da média de 75% quando endurecido e logo após a manipulação. O cimento BC Sealer não apresentou toxicidade. Nenhum dos cimentos avaliados promoveu alteração na relação OPG/RANKL em relação ao controle negativo. Foi possível concluir que a sensibilidade dos testes utilizados para a citotoxicidade foi semelhante sendo que a nova formulação de cimento endodôntico biocerâmico, BC Sealer, foi o único grupo que, *in vitro*, não citotóxico. Os materiais testados não contribuíram para a osteoclastogênese

Palavras-chave: Cimentos endodônticos. Materiais biocerâmicos. Citotoxicidade. Cultura de células. Osteoclastogênese. Osteoblastos. RANKL. Osteoprotegerina.

ABSTRACT

SENNE, Maria Isabel Almeida. **Evaluation of BC Sealer, MTA Fillapex and AH Plus in a cytotoxicity and on the RANKL/OPG balance in human osteoblasts.** 2012. 75 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The aim of this study was to evaluate in vitro the influence of two new formulations of the root canal sealers: Fillapex MTA (Angelus, Brazil) and BC Sealer (Brasseler, USA) and AH Plus (Dentsply, Germany) in cytotoxicity with cultured human cells. From bone fragments discarded after orthopedic surgery from healthy patients. Osteoblasts were cultured in the laboratory and, after confluence, were exposed to extracts of freshly mixed or set sealer for 24h. A group exposed to latex and a group of non-exposed cells served as positive and negative controls respectively. The cytotoxic effects of these sealers was performed by: a test multiparametric for cytotoxicity assay evaluating mitochondrial activity (XTT), membrane integrity (NR) and cell density (CVDE); test IC₅₀; scanning electron microscopy; fluorescent dye with a test to vital cells and flow cytometry to the technology of using two Luminex® panels involving human osteoclastogenesis. After statistical analysis, qualitative and morphological results showed that, compared with controls, the AH Plus was cytotoxic when it freshly ($p < 0.05$) and when used set behavior was similar to the negative control. The MTA Fillapex was cytotoxic when freshly mixed or set, however, the analysis of the dilution rate (IC₅₀), its toxicity was reduced from an average of 75% when this set and when it freshly mixed. BC Sealer was not cytotoxic. No sealer was able to interfere in the relationship OPG/RANKL. This study showed that the sensitivity of the test used was similar to the cytotoxicity and that the new formulation based bioceramics, BC Sealer was the only group that, in vitro, exhibited no cytotoxicity. The materials did not affect the osteoclastogenesis.

Keywords: Endodontic cements. Bioceramic materials. Cytotoxicity. Cell culture.

Osteoclastogenesis. Osteoblasts. RANKL. Osteoprotegerina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cimentos utilizados no experimento.....	39
Figura 2 -	Capela de fluxo laminar.....	40
Figura 3 -	Aparato montado para realizar o experimento.....	41
Figura 4 -	Placa experimental do teste multiparamétrico de 96 poços com meio de cultura e osteoblastos.....	42
Figura 5 -	Placa experimental (MEV) de 24 poços com meio de cultura e osteoblastos.....	43
Figura 6 -	Placa de 24 poços montadas com os <i>clones tubes</i> fixados.....	46
Figura 7 -	Luminex [®]	48
Figura 8 -	Representação gráfica dos osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos.....	50
Figura 9 -	Representação gráfica dos osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos.....	51
Figura 10 -	Representação gráfica dos osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos.....	51
Figura 11 -	Representação gráfica da dose do extrato dos cimentos correspondente ao índice de citotoxicidade que induziu 50% de lise ou morte celular (IC _{50%}).....	53
Figura 12 -	Microscopia eletrônica de varredura demonstrando os efeitos na morfologia celular dos osteoblastos nos grupos controle negativo e experimentais.....	55
Figura 13 -	Microscopia de epifluorescências, mostrando o resultado qualitativo de um campo representativo das células viáveis após o contato por 24h com os extratos dos cimentos estudados e coradas pela carboxifluoresceína (fluorescência verde).....	56
Figura 14 -	Representação gráfica da concentração de OPG e RANKL e razão OPG/RANKL em meio de cultura de osteoblastos expostas por 24h aos extratos dos cimentos indicados.....	58
Figura 15 -	Caso clínico do elemento 36 mostrando alguns <i>puff</i> de cimento endodôntico: setas.....	59

Figura 16 - Representação gráfica da curva padrão do painel OPG.....	75
Figura 17 - Representação gráfica da curva padrão do painel RANKL.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Teste multiparamétrico, XTT – Porcentagem em relação ao controle.....	72
Tabela 2-	Teste multiparamétrico, NR – Porcentagem em relação ao controle.....	72
Tabela 3-	Teste multiparamétrico, CV – Porcentagem em relação ao controle.....	73
Tabela 4-	Teste IC ₅₀ de acordo os cimentos e as respectivas com as diluições.....	73
Tabela 5-	Teste IC ₅₀ , médias de acordo os cimentos e as respectivas diluições.....	74
Tabela 6-	Resultados para o cimento BC sealer logo após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml.....	76
Tabela 7-	Resultados para o cimento BC sealer após o endurecimento medidos em pg/ml.....	76
Tabela 8-	Resultados para o cimento MTA Fillapex logo após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml.....	76
Tabela 9-	Resultados para o cimento MTA Fillapex após o endurecimento medidos em pg/ml.....	77
Tabela 10-	Resultados para o cimento AH Plus após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml.....	77
Tabela 11-	Resultados para o cimento AH Plus após o endurecimento medidos em pg/ml.....	77
Tabela 12-	Resultados para o grupo controle negativo medidos em pg/ml.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alpha-MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha
BB	Bidding buffer
BSS	Balanced salt solution
CC ₅₀	50% cytotoxicity concentration
CFDA	Carboxyfluorescein diacetate
CVDE	Crystal violet dye eluation
EVA	Ethylene vinyl acetate
TGF	Transforming growth factor
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
IC ₅₀	50% inhibition concentration
ISO	International Standards Organization
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium
NR	Neutral red
OPG	Osteoprotegerina
pg/ml	Picograma/mililitro
RNA _m	Ribonucleic acid messenger
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
SEM	Scanning electron microscope
TNF	Tumoral necrosis factor
UFF	Universidade Federal Fluminense
XTT	Xenometrix tetrazolium test

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	RETROSPECTIVA DA LITERATURA	16
1.1	Comportamento biológico dos cimentos obturadores	16
1.2	Os osteoblastos e a importância da expressão RANL/OPG	28
2	PROPOSIÇÃO	34
3	HIPÓTESE	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Material	36
4.2	Métodos	38
4.2.1	<u>Linhagem e cultura de células</u>	38
4.2.2	<u>Seleção dos cimentos</u>	38
4.2.3	<u>Preparo dos cimentos</u>	40
4.2.4	<u>Plaqueamento celular</u>	41
4.2.5	<u>Teste multiparamétrico de citotoxicidade</u>	43
4.2.5.1	Teste com hidróxido de tetrazólio (XTT).....	44
4.2.5.2	Teste com vermelho neutro (NR).....	44
4.2.5.3	Teste com cristal violeta (CVDE).....	45
4.2.6	<u>Teste IC₅₀</u>	45
4.2.7	<u>Teste de microscopia fluorescente para células viáveis</u>	46
4.2.8	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	47
4.2.9	<u>Luminex/Painel OPG e RANKL</u>	48
4.2.10	<u>Aspectos éticos</u>	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Resultados do teste multiparamétrico	50
5.1.1	<u>Resultados do teste com hidróxido de tetrazólio (XTT)</u>	50
5.1.2	<u>Resultados do teste com vermelho neutro (NR)</u>	50
5.1.3	<u>Resultados do teste com cristal violeta (CVDE)</u>	51
5.1.4	<u>Análise dos resultados do teste multiparamétrico</u>	52
5.2	Teste IC₅₀	53
5.3	Microscopia eletônica de varredura	54
5.4	Microscopia de fluorescência	56

5.5	Citometria de fluxo pela tecnologia do Luminex®	57
6	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE - Resultados dos testes estatísticos	72

INTRODUÇÃO

Na busca da melhoria do selamento durante a obturação do sistema de canais radiculares, muitas técnicas foram desenvolvidas através dos anos, especificamente com o objetivo de aumentar a qualidade do selamento apical. Obturar o sistema de canais radiculares significa preencher, o mais próximo possível, o espaço que antes era ocupado pela polpa radicular, com um material inerte e preferencialmente que esse material possa oferecer aos tecidos perirradiculares o repouso necessário para a osteogênese, reinserção do ligamento periodontal, reintegração da lâmina dura e a formação de osteocemento. (GUIMARÃES, 2004)

Após pesquisas recentes (HAMMAD et al.,2009; METZGER et al.,2010; SOMMA et al. 2011) utilizando microtomografia computadorizada em dentes extraídos, muito foi esclarecido entre a associação da anatomia dental e obturação do sistema de canais radiculares. As falhas acentuadas nas mais variadas formas de obturação, parece ter despertado muito o interesse dos clínicos e pesquisadores no que concerne a busca da obturação tridimensional.

Uma breve revisão dos materiais mais populares usados para esse fim, observa-se uma preferência pelo emprego da guta-percha associada a um cimento endodôntico como a combinação mais aceitável para cumprir os requisitos ideais de um material obturador (SCHILDER, 2006). A forma do emprego da guta-percha varia do uso sólido até a forma plastificada e os cimentos mais utilizados variam dos tipos tradicionais à base de óxido de zinco e eugenol, contendo hidróxido de cálcio, resinas orgânicas e mais recentemente à base de *mineral trioxide aggregate* (MTA) e os cimentos biocerâmicos. Inúmeros trabalhos (BODRUMLU, 2008; CAMILLERI et al., 2004; DE-DEUS et al., 2005; KETTERING e TORABINEJAD 1995; KIM et al., 2008; SAIDON et al., 2003; TORABINEJAD et al., 1995; ZHU et al., 2000) demonstrando as boas propriedades do MTA como cimento reparador foram publicados ao longo desses 15 anos comprovando ser esse, um material biocompatível, indutor da osteogênese, dentinogênese e cementogênese. Entretanto, quando utilizado como cimento obturador, ainda faz parte de estudos recentes e várias pesquisas serão necessárias para avaliar suas propriedades, a saber que, sua formulação difere daquela original.

Apesar de descoberto na década de 60 e aplicado clinicamente nos anos 80 (ARCOS, 2008; FRIEDMAN, 1998; HENCH, 2006), os biovidros ganharam força na ortopedia e na cirurgia maxilofacial com o desenvolvimento contemporâneo da nanotecnologia associada aos materiais biocerâmicos (PAPADOPOULOS e ADAMOPOULOS 2007). Com base nos estudos na área da Biomedicina, cimentos à base de biocerâmicas, começaram recentemente serem estudados e utilizados também como material reparador e obturador na Endodontia (DE-DEUS et al., 2012; SHOKOUHINEJAD et al, 2011; XU et al., 2007). Os estudos têm demonstrado resultados promissores desse novo material, suprimindo algumas dificuldades que até então eram encontradas no manuseio do MTA e não obstante desse cimento, também possui formulações distintas segundo sua aplicação clínica.

Outro desafio na Endodontia, além de melhorar a qualidade na obturação do sistema de canais radiculares, tem sido aumentar o índice de sucesso nos casos de necrose pulpar associada a lesões perirradiculares. A resistência da microbiota, nesses casos, ao preparo químico-mecânico, à medicação intracanal e após a obturação (ALVES et al., 2012; SIQUEIRA e RÔÇAS 2008; VERA et al, 2012; VIEIRA et al., 2012), demonstram as falhas na endodontia e ainda a possível associação na incapacidade do organismo em montar uma resposta imunológica que permitiria a eliminação ou controle eficiente dos micro-organismos envolvidos nessa patogenia. A interação entre bactérias e seus produtos e células de defesa do hospedeiro resulta na liberação de numerosos mediadores que, via sistema de canais radiculares, são capazes de iniciar reações imunológicas nos tecidos periapicais. Tais reações incluem a resposta imune inata, que se dá através de mediadores inflamatórios inatos e a resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos T e citocinas, ou mediada por anticorpos, produtos de linfócitos B ativados (resposta imune humoral). Ambas as reações contribuem para a destruição óssea que acontece concomitante à formação das lesões periapicais inflamatórias, cujo intuito é o de conter o avanço da infecção endodôntica. Esse entendimento, poderia estar relacionado ainda, ao equilíbrio no processo de reabsorção e formação óssea pelos osteoclastos e osteoblastos que parece ter dependência direta das proteínas osteoprotegerina (OPG) e o receptor ativador do ligante kappaB (RANKL) (SIMONETI et al., 1997; VERNAL et al., 2006).

Independente da localização, a regeneração óssea depende dos osteoblastos e da síntese e mineralização da matriz extracelular, porém pouco se sabe sobre a

influência dos materiais endodônticos nos tecidos perirradiculares (FOUD et al., 1993). Sabendo que o material obturador permanece em íntimo contato com os tecidos perirradiculares e, não raramente, o cimento forma respingos nesses tecidos, muitas pesquisas avaliando a citotoxicidade dos cimentos obturadores foram realizadas através dos anos (BRACKETT et al., 2008; HO et al., 2006; HUANG et al., 2002; MERDAD et al., 2007; MILLETIC et al., 2000; TORABINEJAD et al., 1995; XU et al., 2010). Estudos mais recentes, começaram a desvendar a repercussão dos materiais endodônticos em osteoblastos utilizando testes multiparamétricos (DE-DEUS et al., 2012; SCELZA et al., 2012) e em outros mecanismos que envolvem a osteoclastogênese com ensaios moleculares para detecção de anticorpos como o PCR (MAEDA et al., 2011; OIVEIRA e SANTOS, 2011; SILVA et al., 2012) e atualmente a utilização de testes imunológicos que, apesar de disponível há mais de vinte e cinco anos, desde os primeiros citômetros de fluxos comerciais, essa técnica só foi difundida há aproximadamente 10 anos com o desenvolvimento de um equipamento mais compacto, pois até então era considerada muito dispendiosa (SANZ et al., 2004).

Conforme ressaltado por Yang et al. (2001), enquanto os microarranjos líquidos tradicionais são apropriados para avaliação de genomas inteiros e poucas amostras e a PCR-RT é útil para análise de muitas amostras mas poucos alvos, os microarranjos líquidos atuais são ideais para a avaliação de dezenas de alvos em muitas amostras. Com o desenvolvimento do equipamento denominado Luminex, alguns trabalhos (TELES et al., 2009; THORMAN et al., 2010; TWETMAN et al., 2009; YUAN et al., 2011) têm demonstrado aptidão desse modelo de ensaio para a detecção dos mais variados analitos e a forte tendência em direção à sua adoção como método de diagnóstico. Ele permite a detecção de ácidos nucleicos e proteínas utilizando uma metodologia de microarranjo líquido que serve como substituta tanto para a técnica de microarranjo tradicional como para os testes imuno-enzimáticos, com a vantagem, sobre este último, de possibilitar análise de diversos parâmetros simultaneamente, utilizando um volume reduzido de amostra. Nos últimos anos, essa tecnologia vem sendo cada vez mais utilizada e espera-se que a medida que essa metodologia amadureça, muitos outros ensaios sejam ofertados comercialmente e que ela passe a ser extensivamente utilizada nos centros de pesquisa.

1 RETROSPECTIVA DA LITERATURA

O presente trabalho enfoca principalmente o efeito citotóxico de dois novos cimentos endodônticos utilizados na obturação do sistema de canais radiculares, entretanto, por apresentar uma literatura muito recente, a abordagem dessa retrospectiva inclui o comportamento biológico dos cimentos mais utilizados para esse fim. Esse capítulo inclui ainda alguns aspectos relevantes da cultura de células humanas selecionadas, considerando a sua importância na realização da metodologia empregada.

1.1 Comportamento biológico dos cimentos obturadores

Tanto na América do Norte como na Europa, existem vários protocolos padronizando a realização de testes biológicos para materiais dentários. Entre os de ampla aceitação está o documento nº 41 da *American Dental Association e da American National Standard* (ADA/ANSI, 2005), que regula os testes biológicos nos Estados Unidos, servindo de referência para pesquisadores do mundo inteiro. Outra normatização também difundida é da *International Standard Organization* (ISO) que a partir de 2009, renovou a regulamentação de 2003 para a realização de testes de citotoxicidade *in vitro*, através do documento ISO 10993-5, listando três categorias para esses testes: testes de difusão do extrato; testes de contato direto e testes de contato indireto, devendo esses, determinar a medição do efeito tóxico sobre cultura de células através da avaliação da injúria celular por achados morfológicos, pela medição dessa injúria, do crescimento celular e pela medição de aspectos específicos do metabolismo celular.

Desde de 1925, quando Rickert propôs o uso de um cimento em conjunto com os cones de guta-percha, utilizando-o como coadjuvante na obturação de canais radiculares, diversos cimentos endodônticos vêm sendo lançados no mercado e amplamente utilizados na prática endodôntica, apesar dessa diversificidade, nenhum, ainda, preenche todos os requisitos necessários de um cimento ideal.(GROSSMAN, 1974)

Parece ser consensual entre a maioria dos autores (HAMMAD et al., 2009; HUANG et al., 2002; PERTOT et al., 1992; RICUCCI, 1998) o fato de que o material obturador deva limitar-se ao interior do sistema de canais radiculares. Da mesma forma, preconiza-se que a obturação deva atingir as proximidades do forame apical. Em algumas situações clínicas, contudo, esse intento nem sempre pode ser alcançado. A realidade da introdução da patência na década de 90 e da instrumentação no limite apical graças à tecnologia dos localizadores apicais na endodontia, mostrou o que até então era pouco observado, o extravasamento de cimento endodôntico como uma consequência desse ato operatório. Levando em consideração que esse cimento ficará em contato com os tecidos perirradiculares muitos estudos foram desenvolvidos afim de estudar seu comportamento biológico.

Friedman et al. (1998), já despertavam para a importância de um cimento à base de fosfato de cálcio para ser aplicado em reconstituições craniofaciais. Os autores afirmaram que o *BoneSourceTM* seria uma nova geração de biomateriais e que, até então, os estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram ser esse um material com potencial futuro em reconstituições complexas.

Leyhausen et al. (1999) propuseram determinar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos cimentos AH26 e AH Plus. Para os testes da genotoxicidade *in vitro*, foram utilizadas culturas de fibroblastos do ligamento periodontal e células 3T3 permanentes, através dos testes procariótico umu e Ames além da inibição na replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA - DIT teste), para o teste *in vivo* foi utilizado um tipo de molusco onde foi observado, pela extração das brânquias, as curvas de diluições capazes de romper as cadeias de DNA. Os resultados não revelaram efeitos genotóxicos ou mutagênicos para o cimento AH plus mostrando apenas uma leve citotoxicidade para os extratos não diluídos.

Guigand et al. (1999), avaliaram a citocompatibilidade de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, à base hidróxido de cálcio e à base de óxido de cálcio em cultura de fibroblastos de rato (NIH3T3). Através das técnicas colorimétrica *methyl thiazolyl tetrazolium* (MTT), microscopia de varredura e citometria de fluxo após o contato por 24, 72 e 168h os resultados mostraram uma citotoxicidade inicial para o cimento à base de óxido de zinco e eugenol e um bom comportamento para os cimentos à base de hidróxido de cálcio e óxido de cálcio.

O efeito citotóxico de quatro materiais obturadores foram testados por Milétić et al. (2000) em duas linhagens de células: carcinomatosa humana (HeLa) e

fibroblastos de ratos (L929). Os cimentos foram manipulados dentro de condições assépticas e 0,01mL foi colocado em placas de 24 poços, após 2h sob luz ultravioleta os cimentos foram cobertos com uma suspensão celular quantificada por período. A citotoxicidade foi estimada pela determinação de células viáveis a luz do microscópio em 24, 48 e 120h. Os resultados obtidos no estudo mostrou uma citotoxicidade mais elevada para o AH Plus que nos cimentos AH26 e Diaket. O Apexit foi o menos tóxico entre os materiais.

Huang et al. (2002), demonstraram os efeitos mutagênicos e citotóxicos de dois cimentos à base de resina epóxi, AH26 e AH Plus. Utilizando o ensaio da atividade enzimática mitocondrial (MTT) em diluições seriadas. Os autores concluíram que esses cimentos não são verdadeiramente biocompatíveis e que isso está ficando mostrado *in vitro* pela relação direta dose-dependente em ambos.

Huang et al. (2002) compararam a citotoxicidade do AH 26; AH Plus; Canals; Endomethasone; N2 e Sealapex em culturas de células primárias humanas do ligamento periodontal (PDL) e de células derivadas do hamster Chinês (V79). Os cimentos foram colocados em discos de vidro e após o endurecimento cada amostra foi coberta por 10mL de meio de cultura e nos períodos de 1, 2, 3, e 7 dias a citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico MTT com corante sulfóxido dimetil. Os resultados mostraram diferenças significantes quanto ao tipo do cimento e alguma diferença na sensibilidade quanto a cultura celular. Em ordem crescente de citotoxicidade o Sealpex foi o menos tóxico seguido do cimento Canals, AH Plus, AH 26, Endomethasone e o N2 que foi o mais tóxico para as duas culturas celulares.

Komath e Varma (2003) publicaram um artigo sobre a utilização de cimento fosfato de cálcio injetável para aplicação em ortopedia e odontologia. As análises quanto as características químicas, físicas e biocompatibilidade desse cimento nas pesquisas realizadas revelaram, segundo esses autores, ser esse um ótimo candidato a procedimentos de ortopedia como fixação de fraturas e em cirurgias de coluna vertebral bem como na utilização dentro da odontologia como cimento obturador e reparador de perfurações radiculares.

Ho, Huang e Chang (2006) estudaram os mecanismos da citotoxicidade do eugenol em osteoblastos humanos através dos efeitos antioxidantes da catalase, superóxido dismutase (SOD) e N-acetil L-cisteína (NAC). As concentrações do eugenol variaram de 0,001 a 2mmol-L⁻¹ e os resultados demonstraram a partir da concentração 0,75mmol-L⁻¹, estabelecida no teste colorimétrico de redução do MTT,

a concentração responsável pela morte de 50% das células (IC50). Mostrando o alto efeito tóxico do eugenol, os autores concluíram que essa substância pode agredir os tecidos periapicais.

Vernal et al. (2006) demonstraram o envolvimento do receptor ativador do fator nuclear (RANKL) em granulomas periapicais. Utilizando a metodologia da transcriptase reversa em tempo real (PCR-RT) os autores compararam 8 amostras de granulomas periapicais com 8 amostras de ligamento periodontal de indivíduos saudáveis. A expressão RANKL foi bem maior nos casos de granulomas sugerindo que seu envolvimento parece estar associado a perda óssea nos casos onde há lesões periapicais.

Bouillaguet et al. (2006), avaliaram a citotoxicidade dos cimentos AH Plus; Epiphany e GuttaFlow em culturas de células (3T3). Os materiais foram manipulados e colocados em tubos de teflon. Após a análise pelo teste de colorimétrico MTT, os resultados revelaram que o cimento AH Plus apresentou uma citotoxicidade moderada nas primeiras 24h que se intensificou após 72h. O cimento Epiphany foi severamente citotóxico em todos os intervalos de tempo, diferentemente do cimento GuttaFlow que foi o que exibiu melhor comportamento entre os materiais testados.

Jiang et al. (2006) descreveram a importância dos lipopolissacarídeos (LPS) liberados por bactérias gram-negativas para o início e progressão das lesões periapicais. Através de um estudo em cultura de osteoclastos e análise por marcação enzimática, extração de DNA e PCR-RT, foi observado que na presença de LPS a quantidade de estímulos para osteoblastos através da produção de RANKL pode revelar a importância no estudo de moléculas farmacêuticas no controle de desordens inflamatórias presentes no osso.

Merdad et al. (2007) estudaram o efeito citotóxico do cimento Epiphany quando comparado ao cimento AH Plus e a guta-percha pelo contato direto ou indireto, utilizando filtros Millipore, cultura de células HeLa e corante vital azul de tetrazólio. Os cimentos permaneceram em contato com a cultura de células por apenas 2h e foram analisados pelo halo de áreas não coradas logo após a manipulação (frescos) e após o endurecimento. Com essa metodologia os autores observaram que o cimento Epiphany quando fresco não excedeu a citotoxicidade do cimento AH Plus nas mesmas condições.

Coon et al. (2007), partindo do princípio que os mediadores inflamatórios como a prostaglandina E₂ (PGE₂) induzida pela enzima cicloxigenase 2 (COX2) faz

parte do processo de progressão de doenças perirradiculares, nortearam um estudo em cultura de osteoblastos e osteoclastos que foram expostas ao ProRoot MTA, AH Plus, Resilon, Guta percha e ao LPS. O estudo demonstrou que a utilização de inibidores seletivos para COX2 pode proporcionar um benefício adicional na reabsorção óssea inflamatória. Os materiais endodônticos testados não foram capazes de induzir diretamente a reabsorção óssea, mas podem contribuir para o retardamento na cicatrização quando extruídos pelos tecidos perirradiculares.

Xu et al. (2007) reportaram que apesar dos promissores resultados dos cimentos à base de fosfato de cálcio na Odontologia, a necessidade da manipulação aumentava muito o desgaste do clínico no momento da sua utilização. Por isso, os autores propuseram cinco formulações pré-manipuladas prontos para uso com diferentes veículos desse cimento e o compararam quanto ao tempo de presa, resistência a tração e compatibilidade em osteoblastos de ratos. Os bons resultados desses cimentos foram semelhantes àquele que envolvia o processo de manipulação indicando que cimentos prontos para uso podem ser promissores para o uso em odontologia.

Gomes-Filho et al. (2007) avaliaram *in vivo* a biocompatibilidade do Endométhasone, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus após o contato com o tecido conjuntivo de ratos. Wistar. Tubos de polietileno foram preenchidos com os cimentos e implantados em na superfície dorsal e removidos após 3, 7 e 30 dias. As peças foram fixadas em glicol metacrilato e processadas para análise microscópica. No terceiro dia 3 houve uma reação inflamatória leve para o Pulp Canal Sealer EWT, entretanto os outros cimentos mostraram uma resposta severa com presença de células inflamatórias agudas. No sétimo dia a organização do tecido foi mais evidente com a atenuação da reação inflamatória, especialmente para os implantes com o AH Plus. No trigésimo dia, o tecido conjuntivo mostrou poucas células inflamatórias para todos os implantes de cimentos. Os autores concluíram que os cimentos apresentaram um padrão semelhante de irritação, sendo mais severa no início e atenuando ao longo do tempo, de tal maneira que todos os cimentos apresentaram uma reação persistente leve.

Eldeniz et al. (2007), procuraram aferir o efeito citotóxico de oito extratos de cimentos endodônticos em dois tipos de culturas: células primárias de gengiva humana (HGF) e células permanentes da linhagem L929. Os cimentos foram utilizados nas formas logo após o endurecimento e após conservado sob condições

favoráveis por 7 dias a partir do teste colorimétrico MTT. Os resultados analisados estatisticamente, mostraram que o cimento Epiphany, EndoRez, Apexit e Acroseal foram significativamente mais tóxicos, no entanto, as células L929 foram mais sensíveis ao Apexit e EndoRez. O RC Sealer mostrou leve efeito nos dois estágios avaliados com maior sensibilidade para as células HGF. O AH Plus não foi danoso e induziu até proliferação celular quando em contato com a amostra estocada. O cimento GuttaFlow foi mais tóxico nas amostras endurecidas e o RoekoSeal foi levemente tóxico para ambas as culturas.

Adamopoulos e Papadopoulos (2007) descreveram sobre o avanço na engenharia óssea com a introdução de materiais biocerâmicos associados a nanotecnologia. Além das específicas aplicações clínicas em cirurgia maxilofacial, citam também a possível substituição de dentes perdidos, preenchimentos em defeitos ósseos e dentários.

Karapanou, Kempuraj e Theoharides (2008) estudaram a presença de interleucina do tipo cicloxigenase (CXCL8) e o fator de necrose tumoral (TNF) em fluidos dos sulcos gengivais de dentes portadores de pulpites irreversíveis. Nos 25 pacientes selecionados no estudo, a presença da CXCL8 foi detectada em 17 pacientes entretanto o TNF não foi observado nessa situação clínica. Os autores concluíram que a presença de níveis altos de cicloxigenase-8 no sulco gengival pode ser uma medida útil para o estadiamento de dentes com pulpite aguda.

Lodiene et al. (2008) compararam a toxicidade de um cimento à base de metacrilato (Epiphany) com três cimentos à base de resina epóxi (AH Plus; RoekoSeal e EndoREZ) utilizando cultura de fibroblastos de ratos (L929) em duas análises metodológicas: por filtro de difusão Millipore e pelo teste colorimétrico MTT. Utilizados logo após a manipulação, os cimentos Epiphany e AH Plus foram severamente tóxicos e os cimentos RoekoSeal e EndoREZ não exibiram toxicidade nos dois estágios. Após o endurecimento apenas o Epiphany mostrou moderada toxicidade quando a análise foi pelo método da difusão. No teste MTT mesmo após o endurecimento, o cimento Epiphany se comportou altamente tóxico e o AH Plus e RoekoSeal com leve citotoxicidade.

Boyce e Xing (2008) estabeleceram a importância do sistema RANKL/RANK/OPG no processo de remodelação óssea como citocinas determinantes no que diz respeito a quantidade e força na formação e reabsorção óssea.

Brackett et al. (2008) avaliaram os efeitos citotóxicos de 5 cimentos endodônticos (AH Plus, Pulp Canal sealer, GuttaFlow, InnoEndo e Real Seal) e 3 tipos de cones (Guta percha obtura; Resilon e Tone) utilizados na obturação radicular, quando em contato direto em culturas de fibroblastos L929 por 72h pelo teste colorimétrico MTT. Sustentando as culturas com soluções equilibradas foi feita uma reavaliação das amostras em 1, 3, 4 e 6 semanas. Os resultados sugeriram que esses materiais endodônticos mostraram elevados riscos biológicos quando o tempo de exposição foi aumentado.

Arcos et al. (2009) citam a importância para a comunidade científica biomédica na concepção de materiais biocerâmicos de terceira geração. Uma revisão crítica sobre os primeiros biovidros mostram a súmula evolução que ocorreu nos últimos anos envolvendo materiais orgânico e inorgânicos. Os mais novos compostos híbridos mostram seu potencial para aplicações para fins regenerativos, juntamente com a possibilidade de ser usado com moléculas biologicamente ativas para a reparação e regeneração óssea.

Koch e Brave (2009) revelaram a mudança que poderá ocorrer na endodontia com a introdução de cimentos biocerâmicos, reverenciando suas boas propriedades físicas e biológicas com uma vantagem adicional de promover uma ligação entre a obturação do sistema de canais radiculares e a dentina.

Zhang, Li e Peng (2010), sabendo das boas propriedades de materiais à base de biocerâmica e reconhecendo a importância de um bom selamento apical dos materiais obturadores radiculares, investigaram a capacidade de selamento da obturação no terço apical após preparo mecânico com diâmetro apical equivalente a 0,3mm. Três grupos com 20 dentes cada foram separados como segue: o grupo A recebeu o cimento iRoot SP com a técnica de condensação de ondas contínuas; o grupo B também com o cimento iRoot SP e a técnica do cone único e o grupo C que recebeu o cimento AH Plus com a técnica de condensação de ondas contínuas. Após a análise pelo método de filtragem de fluidos em 24h, 1, 4 e 8 semanas e uma análise qualitativa por microscopia de varredura. Apesar do cimento iRoot SP ter mostrado melhor adaptação, o comportamento dos materiais não exibiram diferença significativa em todos os grupos testados.

Xu et al. (2010) aferiram a citotoxicidade do sistema RealSeal/cone comparando com o cimento AH Plus e guta percha em cultura de células tipo osteoblastos (MG63). A metodologia baseou-se na norma ISO 10993-5 e mediu,

pelo método MTT, a citotoxicidade dos extratos das amostras nos intervalos de 1 e 3 dias. Os resultados mostraram que o ReaSeal mostrou relativa toxicidade no primeiro dia, assim como o AH Plus, porém foi significativamente mais tóxico que o AH Plus no terceiro dia.

Chang et al. (2010) comparam a citotoxicidade de cinco cimentos: Canals; Canals-N; Topseal, Sealapex e Tubiseal em cultura de fibroblastos humano do ligamento periodontal utilizando a metodologia colorimétrica MTT e achados morfológicos das células por fotomicrografia. Após exposição por 3 e 18h os resultados mostraram que o cimento Canals foi o mais citotóxico, seguido do Topseal, Sealapex e Tibliseal com moderada toxicidade. O cimento Canals-N mostrou leve toxicidade o que levou a conclusão que a alteração na fórmula desse cimento, com a suspensão do eugenol, influenciou positivamente no seu comportamento biológico.

Gencoglu et al. (2010) comparam a biocompatibilidade e a citotoxicidade dos cimentos GuttaFlow e EndoREZs com o Pulp Canal Sealer em 60 ratos Wistar quanto a presença de malondialdeído e glutathione em diversos órgãos, além da análise do soro quanto a presença do fator de necrose tumoral (TNF) e lactato desidrogenase (LDH). Todos os cimentos tiveram comportamento semelhante ao grupo controle, demonstrando boa compatibilidade e toxicidade aceitável.

Os efeitos de dois cimentos reparadores bioaggregate (BA) e MTA em culturas de células do ligamento periodontal humano (PDL) foram investigados por Yan et al. (2010) pelo ensaio MTT e pelo nível de diferenciação celular através da expressão gênica da fosfatase alcalina (ALP) e colágeno tipo I (COL1) analisado por PCR. O número de células no grupo exposto ao BA foi semelhante ao controle, entretanto no grupo do MTA as células foram além do grupo controle. Na análise por PCR os dois materiais foram semelhantes, concluindo os autores que além de não ser tóxico às células PDL, eles induziram a diferenciação celular.

Sha et al. (2011), relataram a importância do conhecimento e da relação entre as citocinas envolvidas na osteoclastogênese com as lesões perirradiculares. Os autores afirmam que o osteoclasto é a única célula capaz de causar destruição óssea e parece que essas células estão envolvidas no processo dessas lesões. Acrescentam ainda que a liberação da osteoprotegerina (OPG), que inativa o receptor do ativador do fator nuclear (RANKL), é uma importante via para bloquear a ação dos osteoclastos. Outra citação relevante foi que a OPG é uma proteína natural

e fácil de reproduzir, podendo ser incorporada em carreadores para serem depositadas nas lesões perirradiculares como parte do tratamento.

Maeda et al. (2011) compararam a proliferação e diferenciação osteogênica *in vitro* do polimetilmetacrilato (Superbond - SB) com um cimento endodôntico à base de metacrilato (Epiphany SE - PE). Células obtidas a partir do ligamento periodontal de terceiros molares humanos (HPDLCs) foram cultivadas e permaneceram em contato com discos dos referidos cimentos após 24h de manipulação e após lavagem por 7 dias. O período de até 3 dias foi avaliado levando em consideração a proliferação celular, as alterações morfológicas pela microscopia de varredura e a expressão gênica da osteopontina e osteocalcina pela análise quantitativa pelo RT-PCR. As células que entraram em contato com os discos lavados exibiram crescimento celular, assim como para o cimento EP sem sofrer a lavagem após o terceiro dia. Para o grupo do SB com os discos inalterados, as células sofreram inibição celular. Os autores correlacionaram a toxicidade inicial do EP com a não polimerização inicial do monômero ou de pela presença de algum outro componente solúvel.

Loushine et al. (2011) investigaram o tempo de endurecimento e a microdureza do cimento BC sealer e o comparou com o cimento AH Plus quanto a toxicidade em cultura de osteoblastos de ratos (MC3T3) pelo método MTT. Quanto ao tempo de endurecimento, os autores relataram que utilizando a técnica da agulha de Gilmore o cimento demorou 168h para alcançar sua presa total. A microdureza realizada pelo teste de marcação de Knoop foi significativamente diminuída quando a água foi acrescida ao cimento. Os cimentos foram inicialmente citotóxicos, sendo que o AH Plus gradualmente diminui sua toxicidade até perder esse efeito enquanto o BC Sealer permaneceu moderadamente tóxico durante 6 semanas, diminuindo porém não extinguindo seu comportamento em 10 semanas.

Shokouhinejad et al. (2011) compararam a resistência de união do cimento biocerâmico BC Endosequence com o AH Plus na presença ou ausência de *smear layer* (lama dentinária). Cinquenta e seis dentes unirradiculares extraídos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos. Os grupos 1 e 3 irrigados por NaOCL a 5,25%; nos grupos 2 e 4 os canais receberam EDTA a 17% seguido do hipoclorito a 5,25%. O cimento AH plus associado a guta-percha foi utilizado nos grupos 1 e 2 e nos grupos 3 e 4 foi utilizado o BC endosequence também associado a guta-percha.

Não houve diferença significativa da resistência de união nem quanto ao tipo de cimento utilizado bem como a remoção ou não da camada de smear layer.

Giovanini et al. (2011), avaliaram a relação entre as reações inflamatórias induzidas por 4 cimentos endodônticos e a ocorrência de fibrose e do número de miofibroblastos com positividade ao α -actina no músculo liso. Tubos de polietileno foram preenchidos pelos cimentos e inseridos em 4 sítios da região de 24 ratos Wistar. Após 7, 21 e 45 dias os animais foram sacrificados e foi realizada a remoção dos fragmentos, processamento histológico e análise imuno-histoquímica. Todas as amostras, exceto o grupo controle, apresentaram reação inflamatória grave no sétimo dia, coincidindo com um grande número de miofibrobalstos. No vigésimo primeiro e quadragésimo quinto dias a reação inflamatória induzida pelo Endofill, AH Plus e Acroseal diminuiu significativamente, assim como os miofibroblastos. Em contraste, o grupo com o cimento Epiphany permaneceu com altos índices em todos os períodos analisados.

Willershausen et al. (2011) estudaram in vitro os efeitos citotóxicos e antimicrobianos dos cimentos GuttaFlow; Endosequence BC, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus Jet sobre fibroblastos do ligamento periodontal e *Enterococcus faecalis* e *Parvimonas micra* respectivamente. A citotoxicidade foi determinada pela proliferação e morfologia celular através do corante fluorescente Alamar Blue® e o potencial antimicrobiano foi determinado pela microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que a toxicidade foi dependente do cimento e do tempo. Após 72 e 96h enquanto os cimentos GuttaFlow e Endosequence BC não mostraram comportamento tóxicos, os cimentos Pulp Canal e AH Plus causaram uma significativa diminuição na proliferação celular. Em contra partida, enquanto o cimento Endosequence BC não mostrou efeito antimicrobiano e o GuttaFlow um demonstrou baixa ação, os cimentos Pulp Canal e AH Plus Jet foram efetivos contra *P micra*. Porém nenhum cimento foi efetivo contra *E faecalis*

Zoufan et al. ainda em 2011, também utilizando esses dois novos cimentos disponíveis no mercado internacional, o GuttaFlow e o BC sealer e dois outros cimentos já rotineiramente usados na Endodontia, o AH Plus e o Tubli-Seal, nos estágios logo após a manipulação e após o endurecimento e compararam a citotoxicidade pela metodologia do MTT. A viabilidade das células L929 foi calculada após o contato com os cimentos diluídos em 300, 600 e 1000 μ L de meio de cultura por análise de variância. Os resultados encontrados demonstraram que o cimento

AH Plus foi o mais citotóxico quando recém-manipulado, seguido do Tubli-Seal e com resultados semelhantes para o BC e o GuttaFlow com menor citotoxicidade. Após o endurecimento, nas diluições a partir de 600 µL, todos os cimentos demonstraram baixa toxicidade.

Silva et al. 2012 investigaram os efeitos de quatro cimentos endodônticos (AH Plus; Endomethasone N, Pulp Canal Sealer EWT e Sealapex) quanto a citotoxicidade e atividade gelatinolítica das metalproteinases (MMP) em fibroblastos humanos. Os cimentos permaneceram em contato direto ou indireto com as células por 30min, 1, 4 e 24h. Por meio da exclusão com o corante azul de trypan todos os cimentos foram tóxicos em ambas as situações sendo o Sealapex com o menor e o AH Plus com o maior nível de citotoxicidade. As células de todos os cimentos secretaram MMP do tipo 2 a partir de 4h sendo mais elevada para o grupo do contato direto.

Borges et al. (2012), confrontaram as alterações de superfície de quatro cimentos contendo silicato de cálcio e um à base de resina epóxi quanto a alteração da solubilidade quanto a liberação de íons com base na especificação da ANSI/ADA nº 57, além disso as superfícies internas e externas de cada amostra foi submetida à análise de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (SEM/EDX). O cimento AH Plus e MTA (Angelus) foram de acordo com as exigências da ANSI/ADA, porém os cimentos MTA Fillapex; iRoot SP e Sealapex não cumpriram o estabelecido. Altos níveis na liberação de Ca_{+2} foi observada, exceto para o cimento AH Plus. Todas as amostras revelaram alterações de superfície após passarem pelo teste da solubilidade.

Salles et al. (2012) estudaram a biocompatibilidade e bioatividade do cimento MTA Fillapex (MTA-F), do Epiphany SE (EP-SE) e do óxido de zinco e eugenol (ZOE) em culturas de osteoblastos humano. A viabilidade das células foi avaliada pelos ensaios MTT e análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A bioatividade do MTA-F foi avaliada pela atividade da fosfatase alcalina (ALP) e detecção de depósitos de cálcio pela coloração do vermelho de alizarina. A espectrometria de raios-X por energia dispersiva foi utilizada para caracterizar quimicamente os cristais de hidroxiapatita. Após análise estatística os autores concluíram que a citotoxicidade do MTA-F diminui gradativamente melhorando ao sétimo dia de avaliação e que esse novo cimento possui uma bioatividade adequada para estimular cristais de hidroxiapatita.

Trubiani et al. (2012), avaliaram as características morfológicas, o crescimento celular e a secreção de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL8) pelas células tronco mesenquimais de polpa dental humana ao serem expostas ao hidróxi-etil-2 metacrilato (HEMA) em duas proporções 3 e 5mmol L⁻¹. Após o período de incubação por 24, 48 e 72h as amostras foram analisadas. Quando submetidas a proporção de 5mmol L⁻¹ as células mesenquimais revelaram um decréscimo significativo em relação a proporção 3mmol L⁻¹. Os efeitos citotóxicos pela análise microscópica demonstrou alterações morfológicas exibindo perda das características fibroblastóide, tornando-se retraída e com grande número de grânulos. Em ambas as concentrações houve um aumento significativo dos mediadores da inflamação, IL-6 e 8.

Scelza et al. 2012 compararam a citotoxicidade dos extratos dos cimentos Sealapex; Pulp Canal Sealer EWT; RealSeal e MTA Fillapex pela análise multiparamétrica utilizando cultura primária de osteoblastos humanos. Após a manipulação dos cimentos a partir de 24h e 7 dias, os meios de cultura entraram em contato por 24h com os extratos de cada amostra e a viabilidade celular foi analisada sequencialmente pelos testes da atividade mitocondrial (XTT); integridade da membrana (NR) e pela densidade total das células (CVDE). Todos os cimentos mostraram altos níveis de citotoxicidade após 24h da manipulação para as três metodologias empregadas. Passado o período de 7 dias da manipulação, a viabilidade das células que entrou em contato com o grupo do cimento Sealapex foi significativamente aumentada e o grupo do Pulp Canal Sealer EWT se equiparou ao controle. Os autores concluíram que a citotoxicidade dos cimentos foi tempo-dependente quando utilizado o teste multiparamétrico de viabilidade celular.

De-Deus et al. (2012), compararam *in vitro* a citocompatibilidade de um novo cimento reparador biocerâmico, pronto para uso, com nome comercial de iRoot BP Plus com o ProRoot branco em cultura de osteoblastos. Após a secção, retropreparo e retro-obturação em incisivos superiores extraídos, cada amostra permaneceu em contato com meio de cultura por 24 e 48h e após, esses extratos foram removidos e transferidos para placas contendo cultura de osteoblastos, onde permaneceram incubados por 24h em condições favoráveis de cultivo. Os resultados foram obtidos pela análise multiparamétrica utilizando os testes XTT, vermelho neutro e cristal violeta. e mostraram que o IRoot BP Plus e o ProRoot não apresentaram efeitos críticos citotóxicos quando comparado ao controle negativo.

1.2 Os osteoblastos e a importância da expressão RANL/OPG

A formação óssea começa no terceiro mês pré-natal dentro da membrana do tecido conjuntivo e seu pico é atingido entre o final da adolescência e início da idade adulta. O osso é um tecido conjuntivo composto principalmente por parte inorgânica (cristais de hidroxiapatita – 65%) e parte orgânica (35%). O componente inorgânico confere força e rigidez, além de funcionar como depósito de íons cálcio, fósforo e magnésio. O componente orgânico inclui as proteínas e as células ósseas, chamadas de osteoprogenitoras que trabalham no crescimento ou reparo dos ossos. Estas células são originárias de células-tronco encontradas na medula óssea. A medula óssea é composta por várias camadas celulares e é em uma dessas camadas que albergam estas células. Existem evidências citadas por Owen, Cavé e Joyner (1987), que o estroma da medula óssea é morfologicamente heterogêneo e todas as células são derivadas de uma única pluripotente dando origem a progenitores de diferentes células mesenquimais (osteoblasto, adipócito, mioblasto, condroblasto e fibroblasto). O processo de diferenciação osteoblástica é iniciado e dirigido pelo fator de transcrição nuclear que ativa a expressão do gene osteoblasto-específico. Além da mineralização óssea, outra função de osteoblastos é a diferenciação em osteócitos, que são células do osso maduro que já não são capazes de divisão celular, porém são capazes de detectar o estresse mecânico, iniciando assim a reabsorção óssea. Osteócitos se alojam dentro de lacunas do osso e desempenham um papel fundamental na osteoclastogênese. Esse, é um fenômeno complexo, facilitado pela integração dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos com as células do estroma da medula óssea.

A remodelação óssea é um processo dinâmico, que resulta da atividade acoplada entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e de formação óssea pelos osteoblastos e é mantido a longo prazo por um complexo sistema de controle que inclui hormônios, fatores físicos e fatores humorais. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea. O processo de formação óssea ou osteogênese decorre em 3 etapas: a produção de matriz orgânica extracelular ou osteóide, a mineralização da matriz com formação de osso e a remodelação óssea com reabsorção seguida da formação de novo osso e a

atividade celular dos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos é fundamental neste processo. Os osteoblastos sintetizam os precursores moleculares da matriz óssea e regulam a sua mineralização. À medida que progride o processo de formação óssea, os osteoblastos preenchem as lacunas de reabsorção produzidas pelos osteoclastos, produzem osteóide e passam a denominar-se osteócitos. (PARFITT, 1982 e SIMONET et al., 1997).

Durante os últimos 15 anos, grande volume de conhecimento foi acumulado o que permitiu a identificação de um fator produzido pelas células estromais e pelos osteoblastos, que é crítico para a formação do osteoclasto. Esse fator é o RANK ligante (*receptor activator of NF- κ B ligand*), também conhecido como TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*), um novo membro da família do fator de necrose tumoral (TNF) que foi citado por Simonet et al. (1997) e bem esclarecido por Yashuda et al. em 1998. Eles mostraram que a maioria dos fatores osteotrópicos agem indiretamente se ligando a células estromais da medula óssea, que por sua vez induzem um aumento da expressão de RANK ligante (RANKL), que então se liga ao receptor de RANK-L e induz a formação de osteoclasto. A atividade de RANKL pode ser bloqueada por osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibidor da osteoclastogênese, que se constitui numa proteína relacionada ao receptor de TNF. OPG é produzida pelos osteoblastos e bloqueia o estágio de fusão/diferenciação na diferenciação osteoclástica. Afirmaram ainda que, RANK-L se liga à OPG e bloqueia suas ações inibitórias na osteoclastogênese. Assim, RANK-L e OPG são importantes reguladores da formação e atividade do osteoclasto produzido pela medula óssea

Boyle, Simonet e Lacey (2003), publicaram um artigo revisando alguns aspectos sobre a osteoclastogênese, citando os avanços na compreensão sobre os aspectos fisiológicos e patológicos na remodelação óssea, liberação de cálcio e densidade óssea. Após a descoberta da relação de hormônios, citocinas e fatores tumorais produzidos em órgãos, mesmo que distantes, parece haver um efeito inverso sobre a relação entre osteoblasto e osteoclasto. A maioria, se não todos, hormônios calciotrópicos e próreabsorção como as citocinas têm sido mostrados para um aumento na expressão do RNA mensageiro de RANKL em linhas celulares de osteoblastos e de culturas de células primárias. OPG, que bloqueia a osteoclastogênese induzida por RANKL, pode inibir a formação de osteoclastos e reabsorção óssea induzida por tratamento com fatores calciotrópicos, indicando que

a via de sinalização RANK em osteoclastos integra diversos sinais humorais que regulam a reabsorção óssea e homeostase do cálcio.

A expressão OPG/RANKL foi primeiramente detectada em odontoblastos, ameloblastos, células da polpa e do ligamento periodontal por Sakata et al. em 1999, assim como sua relação com granulomas e cistos periapicais citada por Tay et al. (2004); Vernal et al. (2006) e Menezes et al. (2006).

Taubman et al. (2005) revisaram sobre os mecanismos correlacionados à resposta imune do hospedeiro na infecção periodontal e reabsorção do osso alveolar. Eles citaram que nos seres humanos com doença periodontal existe, comprovadamente, um aumento na produção de linfócitos T e conseqüentemente uma elevada expressão no RNAm de RANKL, bem como uma diminuição no RNAm de OPG. Os autores concluíram sobre as necessidades de novos estudos para que se possa viabilizar uma prevenção ou abordagem terapêutica utilizando esse conhecimento, no caso dessas doenças.

Ho, Huang e Chang (2005), citaram que os osteoblastos são significativamente representada nos tecidos periapicais e poucos estudos são realizados com esse grupo celular. Eles relataram a importância do uso desse tipo de cultura quando se deseja conhecer a citotoxicidade de cimentos endodônticos.

Zhang e Peng (2005), observaram a localização imuno-histoquímica de RANKL em diferentes estágios de desenvolvimento de lesões periapicais em ratos. Os resultados mostraram que parece existir uma influência dessa proteína na diferenciação de préosteoclastos em osteoclastos sugerindo que ela pode ter um papel importante na reabsorção óssea alveolar na região periapical.

Baseados na forte indicação que RANKL seria um componente essencial na ativação dos osteoclastos e portanto poderia desempenhar um importante papel na destruição óssea periapical durante o desenvolvimento da lesões inflamatórias, Vernal et al. (2006) conduziram um estudo, buscando relacionar os níveis de RANKL (RNAm) em granulomas periapicais. Utilizando o PCR-RT para investigar o infiltrado de células leucocitárias responsáveis pela síntese de RANKL em citometria de fluxo, os resultados encontrados mostraram altos níveis de RANKL em granulomas periapicais quando comparados com o ligamento periodontal sadio, sugerindo que o envolvimento da expressão RANKL pode estar relacionada com a destruição óssea em lesões periapicais.

Menezes et al. (2006), pesquisaram a determinação da expressão do fator ativador RANKL e OPG com destruições ósseas em cistos e granulomas periapicais. Após o processamento histológico de 40 peças cirúrgicas terem sido removidas por lesões periapicais crônicas, 10 granulomas e 10 cistos foram selecionados e analisados por imuno-histoquímica. Os resultados sugeriram fortemente o envolvimento de OPG/RANKL no desenvolvimento de cistos e granulomas.

Kawashima et al. (2007), estudaram a cinética do envolvimento do receptor ativador para NFkB ligante (RANKL), RANK, osteoprotegerina (OPG) e citocinas em lesões periapicais induzidas em ratos. Através da avaliação pelo PCR-RT os autores concluíram que a expressão RANKL e a presença de citocinas envolvidas com a inflamação estão correlacionadas com a expansão de lesões periapicais.

Zhang et al. (2007) estudaram os efeitos da deficiência de estrogênio no receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL) e na síntese de osteoprotegerina (OPG) em lesões periapicais que foram induzidas em ratos ovariectomizadas. Através das análises enzimática (fosfatase ácida) e imuno-histoquímicas (OPG/RANKL) os autores observaram que a manutenção de níveis do estrogênio parece que reduz, indiretamente, a produção de fator estimulador de colônias de macrófagos, RANKL, interleucina-1, interleucina-6 e TNF por osteoblastos e células estromais, excitando a produção de OPG e TGF considerando que essa possa ser uma resposta reativa para resistir a reabsorção óssea.

Menezes et al. (2009) investigaram o padrão do RNAm na expressão RANKL e OPG, comparando granulomas periapicais com sítios ósseos saudáveis e com pressão ortodôntica; doença periodontal e tecido gengival saudável. Através da análise por PCR-RT, os resultados demonstraram que a expressão RANKL foi maior que OPG nas amostras onde havia força de compressão ortodôntica e OPG maior que RANKL no sítio onde havia tensão. Para os casos de gengiva saudável e gengivite crônica as expressões apontaram uma equivalência porém, nos casos de periodontite crônica a expressão RANKL foi menor que OPG. Considerando o tamanho radiográfico dos casos com granulomas com menos de 5mm a expressão RANKL foi maior que OPG e nas lesões maiores a maior frequência foi do equilíbrio entre essas duas expressões.

Fukada et al. (2009) buscaram esclarecer o papel dos fatores reguladores dos linfócitos T helper e dos fatores envolvidos na quimiotaxia e ativação dos

osteoclastos (RANKL e OPG) em cistos e granulomas periapicais. A expressão gênica, utilizando a metodologia do PCR-RT em gengivas saudáveis e granulomas e cistos periapicais em relação aos osteoclastos mostrou que a expressão RANKL foi significativamente maior nos granulomas e OPG foi maior em ambas as lesões quando comparados a gengiva saudável.

Fan et al. (2011) investigaram a possível associação entre a expressão dos reguladores de reabsorção óssea (RANKL e OPG) e o infiltrado inflamatório na periodontite apical crônica. Através da análise imuno-histoquímica, em 40 amostras de lesões periapicais crônicas comparadas com 10 amostras de tecidos do ligamento periodontal sadios de pré-molares extraídos por necessidade ortodôntica, foi encontrado que todas as lesões periapicais mostraram imunorreatividade positiva para RANKL e OPG com diferentes níveis no infiltrado inflamatório. Os autores concluíram que RANKL parece estar diretamente relacionada com as reações inflamatórias periapicais e a proporção RANKL/OPG pode ser um fator determinante na reabsorção óssea mediada por RANKL.

Silva et al. (2012), caracterizaram experimentalmente a formação e progressão de lesões periapicais induzidas em duas espécies de camundongos após 7, 21 e 42 dias. As peças foram estudadas por histopatologia com coloração convencional (hematoxilina-eosina) e coloração específica bacteriana (Brown e Brenn). Avaliaram também a presença da fosfatase ácida tartarato-resistente, que reflete o número de osteoclastos em atividade e a ativação de RANK, RANKL e OPG por análise imuno-histoquímica. Os resultados apontaram que uma espécie de rato (27 TLR2 KO) desenvolveram lesões maiores com maior número de osteoclastos que ratos selvagens (*Wild*), indicando a importância do hospedeiro na resposta imune e inflamatória contra a infecção do canal radicular.

Diante do exposto, a linhagem de osteoblastos humano associada a metodologia descrita adiante, parece estar bem indicada para estudos *in vitro* que testam a citotoxicidade dos cimentos utilizados na obturação do sistema de canais radiculares.

2 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo consiste em avaliar a citocompatibilidade de três cimentos utilizados na prática endodôntica, em cultura de osteoblastos humanos, através de um teste multiparamétrico com três análises; avaliar o balanço RANKL/OPG por meio da citometria de fluxo pela tecnologia do Luminex®, alteração morfológica por microscopia de varredura; determinação da IC50 e teste qualitativo por corante vital fluorescente.

3 HIPÓTESE

Os testes de hipóteses são usados para verificar se as diferenças entre os valores da amostra e os valores da população são devidos ao acaso. A hipótese nula, representada por H_0 , é uma hipótese que é apresentada sobre determinados fatos estatísticos e cuja falsidade se tenta provar através de um adequado teste de hipóteses. Uma hipótese nula geralmente afirma que não existe relação entre dois fenômenos medidos. Em contrapartida, a(s) hipótese(s) alternativa(s), é formulada para testar a hipótese contrária à hipótese nula e pode ser tanto para mais quanto para menos. (OBID, 2012)

3.1 Hipóteses

Situações hipotéticas desse estudo:

- a) Hipótese nula: não existe diferença significativa quanto a citotoxicidade e no balanço OPG/RANKL entre os cimentos testados e o grupo controle negativo para os testes empregados.
- b) Hipóteses alternativas
 - Existe diferença significativa quanto a citotoxicidade entre os cimentos testados e o grupo controle negativo, nos testes empregados.
 - Existe diferença significativa entre o balanço OPG/RANKL para os cimentos testados e o grupo controle negativo, no teste empregado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Cimentos obturadores do sistema de canais radiculares: AH Plus, MTA Fillapex e BC sealer.
- Células: osteoblastos humanos.
- Garrafas para cultura de células (Corning, New York, USA).
- Meio Alfa-MEM (Cultilab, Campinas, São Paulo).
- BSS (Tampão Fosfato-Salina 0,01M).
- Tripsina/EDTA (Gibco, São Paulo).
- Soro fetal bovino.
- Centrífuga Excelsa® II mod. 206 BL (Fanem, São Paulo, SP).
- Suportes para tubos de ensaio.
- Tubos de ensaio 15ml (Corning, New York, USA).
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 5ml.
- Pipetador.
- Bulbos.
- Micropipetas (1 e 3 μ l).
- Ponteiras para pipetas.
- Lima #80 (Maillefer, Suíça).
- Placa de EVA.
- Placas de poliestireno de 24 poços (TPP - Techno Plastic Products, Suíça).
- Placas de poliestireno de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Suíça).
- Kit In Cytotox®. (Xenometric Inc, Allschwill, Suíça).
- Leitor de microplacas (Synergy II, BioTek instruments, Winooski, VT, USA).
- Luminex® (LuminexCorp, Austin, TX, USA).
- Placas de 96 poços com microporos (LuminexCorp, Austin, TX, USA).
- Painel ósseo humano 1A para OPG e RANKL (Millipore Corporation, Billerica, MA).
- Placa de vidro.
- Espátula n.º 24.
- Microscópio ótico (Olympus).
- Microscópio Invertido (Zeiss).

- Aparelhagem para microscopia de varredura.
- Corante fluorescente carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich; St. Lois, USA).

4.2 Métodos

Toda a metodologia foi baseada na Norma ISO 10993 (1999) e no protocolo de rotina utilizado no laboratório de cultura celular na UPC-HUAP (UFF), sendo previamente testada em três estudos pilotos objetivando minimizar as variáveis incontroláveis e assegurar resultados mais confiáveis,

4.2.1 Cultura das células

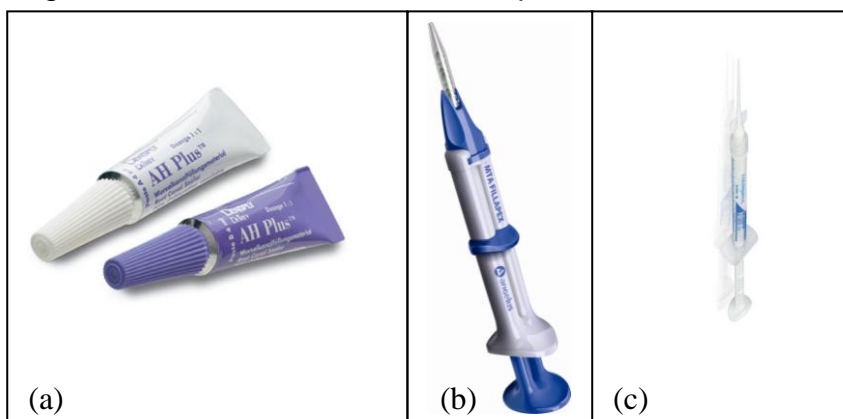
Para o experimento foi segmentado s osteoblastos humanos que, a partir de fragmentos ósseos descartados pós-cirurgia ortopédica no HUAP, de indivíduos saudáveis, foram cultivados e mantidos em garrafas de cultura, em meio Alfa-MEM suplementado por 10% de soro fetal bovino (FCS) e antibióticos (Penicilina 10.000 U.I./ml; estreptomicina 10mg/ml e sulfato de gentamicina 50mg/ml) em estufa a 37°C em atmosférica umidade com 5% de CO₂ até atingirem confluência. Para manter a proliferação celular, o meio de cultura foi trocado a cada 48h.

4.2.2 Seleção dos cimentos

A escolha dos cimentos foi baseada em estudos atualizados que elegem o AH Plus como padrão ouro (BRACKETT et al., 2006; NUNES et al., 2008; HIRAI et al., 2010; ASSMAN et al.,2012) no universo dos cimentos utilizados na obturação do sistema de canais radiculares, comparando-o com dois novos cimentos lançados recentemente, o MTA Fillapex à base de MTA e o BC sealer à base de biocerâmica (Figura 1).

As fórmulas dos cimentos estão dispostas no Quadro 1, de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes.

Figura 1- Cimentos utilizados no experimento



Legenda: (a) AH Plus; (b) MTA Fillapex e (c) BC Sealer
Fonte: A autora, 2012.

Quadro 1 – Fórmula dos cimentos segundo informações dos fabricantes

CIMENTO	APRESENTAÇÃO	FÓRMULA
AH Plus (Dentsply Konstanz - Alemanha) Lotes: 1007000173 e 1103000574	Pasta A (base) Pasta B (catalizador)	Resina epóxica Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óxido de ferro Amina AdamantanaN, N-Dibenzil-5-oxanonane-diamina-1,9 TCD-Diamina Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óleo de silicone
MTA FILLAPEX (Angelus do Brasil, Londrina – Paraná – Brasil) Lotes: 17813 e 19046	Seringa pasta A e B	Resina salicilato Resina diluente Resina natural Óxido de bismuto Sílica nanoparticulada Trióxido agregado mineral Pigmentos
BC Sealer (Brasseler, Savana, Georgia – Estados Unidos da América Lote: 10003SP	Seringa	Óxido de zircônio Silicato tricálcio Silicato dicálcio Hidróxido de cálcio

Fonte: A autora, 2012.

4.2.3 Preparo dos cimentos

Os cimentos utilizados foram manipulados, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar (Figura 2), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

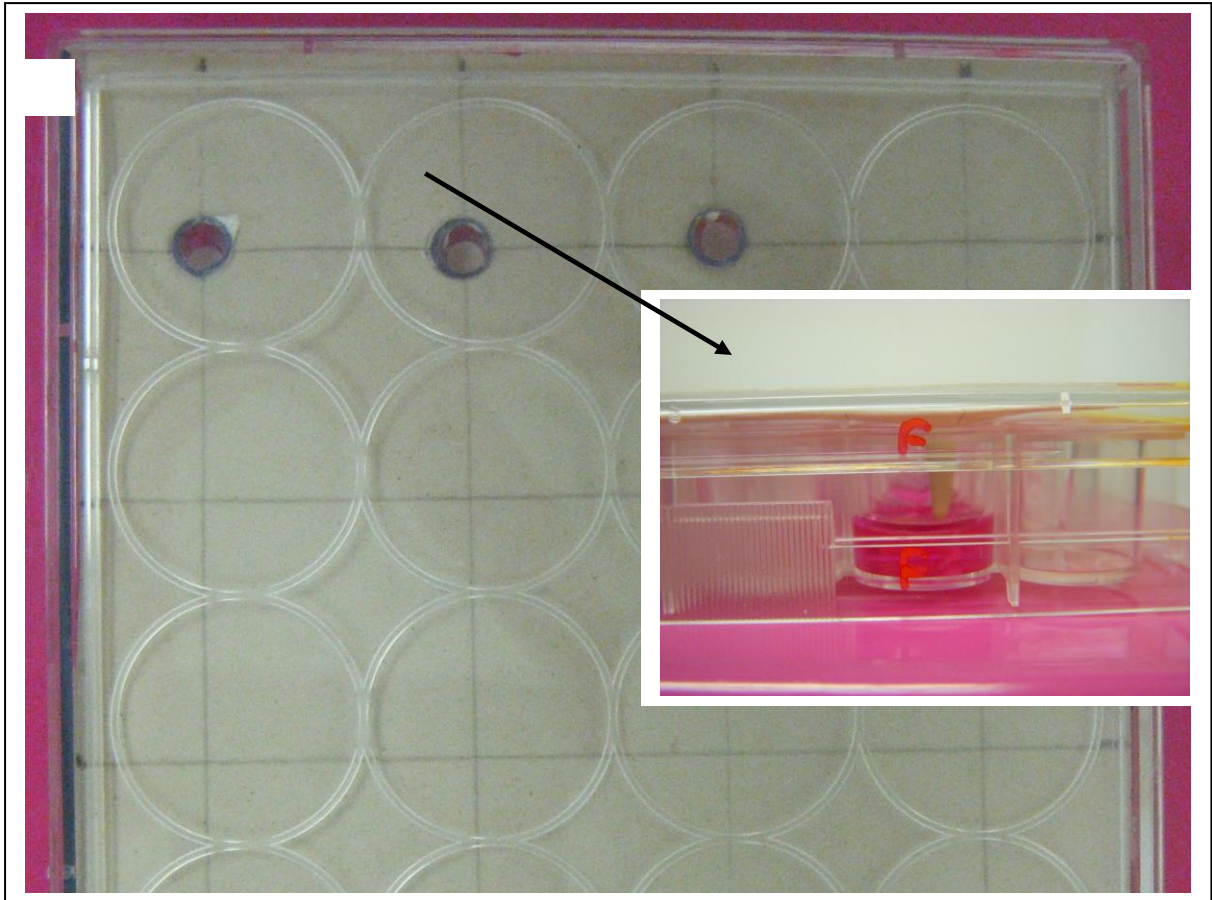
Um aparato experimental foi montado (Figura 3) em uma placa de 24 poços para cada experimento, no qual uma placa de EVA sustentava seis tubos cônicos, simulando um canal radicular com diâmetro de ponta equivalente a uma lima tipo K #80 que receberam 0,02ml de cada cimento em dois estágios distintos: três amostras logo após a manipulação (cimentos frescos) e três amostras após o endurecimento - *overnight* (cimentos endurecidos). Uma placa com três tubos cônicos sem cimento foi separada para controle negativo e outra placa contendo látex serviu de controle positivo. Os cimentos permaneceram em contato por 24h com 300µl de meio de cultura Alfa-MEM sem SFB e incubados a 37⁰C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, esses extratos foram removidos e imediatamente utilizados nos testes multiparamétrico, microscopia de varredura, IC₅₀ e microscopia de fluorescência. Para o teste no Luminex os extratos permaneceram congelados a -80⁰C, até o momento do uso.

Figura 2- Capela de fluxo laminar



Fonte: A autora, 2012.

Figura 3- Aparato montado para realizar o experimento



Fonte: A autora, 2012.

4.2.4 Plaqueamento celular

Paralelamente a preparação dos extratos, o plaqueamento dos osteoblastos humano foi realizado através da remoção das células onde permaneciam armazenadas em garrafas, para uma placa de 24 ou 96 poços através do processo de tripsinização conforme descrito a seguir.

Primeiramente foi feita a remoção do meio de cultura Alfa-MEM e lavagem com solução BSS por três vezes com pipeta Pasteur. Posteriormente 2ml de tripsina/EDTA, foi colocado sobre as células confluentes por até 2 min e, através do controle em microscópio invertido, foi observado o desprendimento desejável. Assim 1ml de meio Alfa-MEM era acrescentado objetivando neutralizar a ação da tripsina. Nesse momento, todo conteúdo da garrafa era transferido para um tubo Falcon de

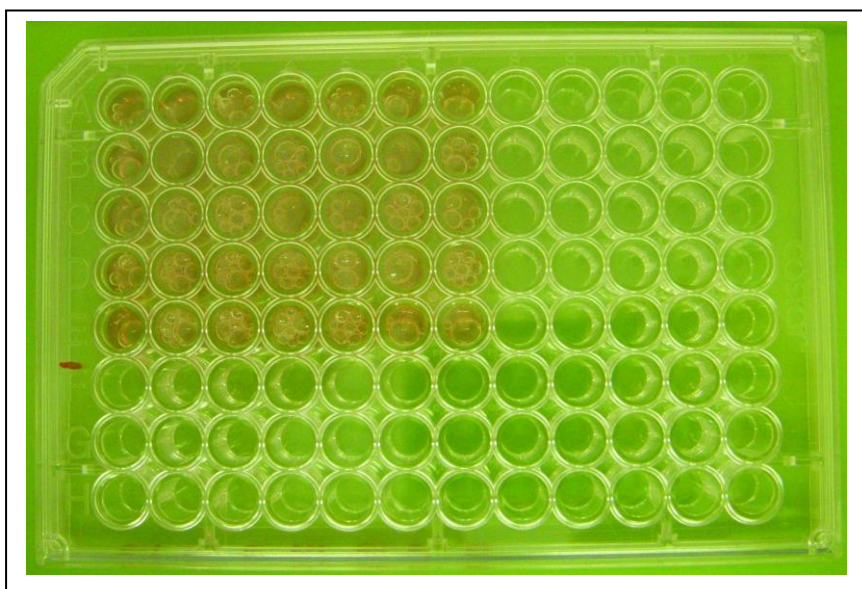
15ml e ainda, para que fosse removido qualquer conteúdo ainda residual, 1ml de BSS foi utilizada por mais duas vezes e somado ao tubo de ensaio.

Passada essa etapa, o tubo Falcon foi levado a uma centrífuga com 10.000rpm por 3min para formação do *pellet* de células. Com o objetivo alcançado, o sobrenadante foi desprezado e 1ml de meio Alfa-MEM com 10% de SFB suplementado pelos três antibióticos já citados, foi colocado no tubo para ressuspensão celular. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, todo conteúdo foi homogeneizado e uma amostra foi levada à câmara de Neubauer para conferência da contagem celular reverenciando a normatização ISO 10993.

Após a contagem total, o número de células foi ajustado para uma concentração final de 10^4 cel/ml para os testes: multiparamétrico, IC_{50} , microscopia de varredura e Luminex e 7^4 cel/ml para o teste de fluorescência, 200 μ l desse meio foi colocado em placa de 96 ou 24 poços (Figuras 4 e 5), de acordo com cada teste.

Finda essa etapa, as placas foram incubados em estufa a 37 $^{\circ}$ C, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO $_2$, também por 24h, estando prontas para os testes que seguem.

Figura 4 - Placa experimental do teste multiparamétrico de 96 poços com meio de cultura e osteoblastos



Fonte: A autora, 2012.

Figura 5- Placa experimental (MEV) de 24 poços com meio de cultura e osteoblastos



Fonte: A autora, 2012.

4.2.5. Teste multiparamétrico de citotoxicidade

O estudo citotológico multiparamétrico foi realizado com base em pesquisas fundamentadas (MILÉTIC et al., 2000, HUANG et al., 2002, DE-DEUS et al., 2009, XU et al., 2010, TRUBIANI et al., 2010, SCELZA et al., 2012) utilizando o *KIT In Cytotox*® que permitiu analisar sequencialmente, em cada poço, a viabilidade celular por três testes: hidróxido de tetrazólio (XTT); vermelho neutro (NR) e cristal violeta (CVDE) .

Passado o período de 24 horas e observada a confluência das células, o meio de cultura foi removido de todas as placas de 96 poços e, no grupo experimental foi substituído por 180µl dos extratos de cada cimento. Nas placas com o controle positivo o meio foi substituído por 180µl extrato do látex e as placas com o controle negativo foi realizada apenas a troca por 180µl de novo meio de cultura. Todas as amostras foram complementadas com 20µl de SFB totalizando 200µl de solução em cada poço, obtendo-se assim cinco réplicas de cada condição experimental. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa InStat® 3.01 (GraphPad Software, USA). As médias dos valores e desvios padrão foram calculados e

verificados com relação à sua distribuição normal (teste de D'Agostino). No plano inferencial, após constatar a normalidade dos dados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de um critério, como pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas ao nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

4.2.5.1 Teste com hidróxido de tetrazólio (XTT)

O teste XTT é um ensaio colorimétrico que serve para quantificar o metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória das células em resposta a compostos farmacêuticos, químicos e ambientais. Os sais de tetrazólio XTT (hidróxido de 2,3,-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)-carbonil]-2H-tetrazólio) são usados para medir a atividade metabólica de células viáveis que são reduzidos a formazano pelo succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima ativa somente em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. O formazano é quantificado fotometricamente em 480nm e é relacionado com o número de células viáveis.

4.2.5.2 Teste com vermelho neutro (NR)

O teste NR é uma análise colorimétrica para quantificação de permeabilidade de membrana e atividade lisossômica de células em resposta a compostos farmacêuticos, químicos e ambientais. O procedimento de análise do NR é um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar e assimilar o vermelho neutro dentro dos lisossomos. Normalmente, é realizado em células aderentes. O NR é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos (pH lisossômico $<$ pH citoplasmático), onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica. Mudanças na superfície celular ou na sensível membrana lisossômica levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de

xenobióticos resultam na diminuição da absorção e assimilação do NR. Assim, é possível distinguir células viáveis, danificadas ou mortas, o que é a base do ensaio. A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectrometria, a 540nm e é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta.

4.2.5.3 Teste com cristal violeta (CVDE)

A análise colorimétrica CV serve para quantificar o DNA nuclear e o número de células para avaliação de toxicidade de compostos farmacêuticos, químicos e ambientais. O CV é um corante que se acumula no núcleo celular, medido fotometricamente a 540nm, que após a solubilização é correlacionado com a quantidade de DNA nuclear e, assim com o número de células aderentes em cada poço.

Seguindo as informações do fabricante, os corantes, prontos para uso, foram aplicados sobre as placas de 96 poços e passaram pelo leitor de microplacas UV/Vis.

4.2.6 Teste IC₅₀

Para esse ensaio, baseado no comportamento citotóxico de cada cimento no teste multiparamétrico, uma placa de 96 poços foi utilizada e a partir da concentração de 100% em 100µl do extrato acrescido de 10% de soro foi realizada as diluições de 75%, 50% e 25% em triplicatas. Utilizando o teste XTT do *Kit in cytotoxic®*, a média da porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle de células (100%) foi observada por análise de regressão linear em função da concentração do extrato para se alcançar a equação da reta que foi calculada com a ajuda do programa *Excel*. A partir da substituição da variável y (viabilidade celular como % do controle) pelo valor de 50%, foi encontrada a dose de extrato correspondente ao índice de citotoxicidade que induziu 50% de lise ou morte celular (IC_{50%}).

4.2.7 Teste de microscopia fluorescente para células viáveis

No teste da microscopia fluorescente, foi utilizado o corante Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) que permite avaliar a integridade da membrana plasmática que, devido às suas características moleculares e pelo mecanismo de ação desse corante fluorescente e por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras corem-se em verde.

Assim, com base nos resultados obtidos no teste multiparamétricos, os grupos dos cimentos com resultados citotóxicos foram selecionados e utilizados. Neste experimento as células (7^4 cel/ml) foram cultivadas em *clone tubes* fixados com cola de silicone em lamínulas de termanox e armazenadas em placas 24 poços (Figura 6). Após a confluência (24h), os osteoblastos foram expostos a 180 μ l dos extratos dos cimentos somados a 20 μ l de SFB e após o contato por 24h foi iniciado o processo de fluorescência conforme descrito: todo conteúdo dos poços foi removido e lavado com 200 μ l de PBS, assim os *clone tubes* foram descolados e as amostras foram lavadas com 50 μ l de por três vezes com a solução de BB e finalmente expostos a uma alíquota de 50 μ l do corante fluorescente carboxifluoresceína por 10min abrigados da luz. Em seguida todos os espécimes foram novamente lavados por quatro vezes com a solução de BB, montados em lâminas com a lamínula invertida em 5 μ l de BB.

Figura 6 - Placa de 24 poços montadas com os *clones tubes* fixados



Fonte: A autora, 2012.

As amostras coradas foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 20x por microscopia de epifluorescência (Zeiss®), permitindo a diferenciação das

células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devida à marcação pela carboxifluoresceína). Para cada amostra avaliada 10 microfotografias de campos distintos foram tiradas permitindo uma análise qualitativa.

4.2.8 Microscopia eletrônica de varredura

Nas análises realizadas por da microscopia eletrônica da varredura (MEV), as células foram cultivadas em lamínulas de termanox contidas nas placas 24 poços. As amostras foram fixadas com Karnovsky, (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em cacodilato) e lavadas três vezes com tampão cacodilato. Em seguida, foi feita a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato por três vezes.

Finalizando essa etapa seguiu-se para a desidratação que foi realizada de forma bem lenta, com concentrações crescentes de etanol: 15, 30, 50, 70, 90, 95, e 100% por três vezes. A secagem do material foi feita pelo método do ponto crítico com CO₂, em um aparelho Balzers CDP-20 (Balzers Union, Fürstentun, Liechstenstein). Assim sendo, as amostras foram montadas em suportes especiais e cobertas com um filme de ouro durante um minuto em um metalizador Balzers (Balzers Union). Após, todo o material foi observado em microscópio de varredura JEOL 5310, pontuando uma avaliação qualitativa das células quanto às mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento e lise total ou da membrana.

4.2.9. Luminex[®]/Painel de OPG e RANKL

Este equipamento (figura 7) consiste em um citômetro de fluxo compacto, composto por um processador de sinal digital e dois canais de lasers capazes de excitar os fluorocromos das microesferas e de uma molécula repórter que nesse caso são os corantes streptavidina e ficoeritrina. A intensidade da fluorescência emitida, é proporcional à concentração do alvo na amostra. Cada microesfera é analisada individualmente pelo equipamento Luminex, capaz de excitar os fluoróforos e

detectar o sinal emitido por eles, classificando as microesferas de acordo com sua assinatura espectral (código de cor) e quantificando a reação ocorrida em sua superfície. Como os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo desempenham importante papel desde as metástases ósseas até as inflamações crônicas como é o caso das periodontites periapicais foi selecionado o painel contendo microesferas de detecção de anticorpos ósseo humano para OPG, lote 1774091 e para RANKL, lote 1774093.

Figura 7 - Luminex[®]



Fonte: A autora, 2012.

Para iniciar o experimento, as células foram descongeladas em temperatura ambiente e os reagentes utilizados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante os quais continham as microesferas de anticorpo, controle de qualidade, solução tampão e painel selecionado, no caso OPG e RANKL, sendo divididos em grupo padrão e os grupos de trabalho padrão, onde são realizadas seis diluições seriadas para se obter o que o programa nomeia de curva padrão.

Uma placa de filtro própria de 96 poços foi previamente umedecida com 200 μ l de solução tampão de lavagem e mantida selada em um agitador de placas por 10min. Enquanto isso, foram separados seis tubos de polipropileno etiquetados para preparação de diluições seriadas, adicionando 150 μ L de solução tampão para cada tubo e transferindo, em sequência 50 μ L do segundo tubo para o terceiro e assim sequencialmente, nomeando-os como padrão 1 (sem diluição), padrão 2, padrão 3, Padrão 4, Padrão 5, padrão 6 e padrão 7.

Estando a placa umedecida, todo o conteúdo foi removido cuidadosamente a vácuo, sendo assentado em lenço de papel para secagem total. Assim, todos os poços receberam 25µl de solução tampão. Os poços equivalentes ao grupo padrão somaram 25µl das soluções com as respectivas diluições, dois poços receberam 25µl da solução teste para corresponderem a 0pg/ml como *background* e 25µl dos extratos foram dispensados nas placas nos poços dos grupos experimentais. Finalmente cada poço recebeu 25µl da solução com as microesferas. A placa foi selada e permaneceu em um agitador por até 20h a uma temperatura de 4^oC sempre ao abrigo da luz. Passado esse tempo, todo o conteúdo da placa foi removido a vácuo e todas as amostras foram lavadas por três vezes com 200µl da solução de lavagem sempre usando a sucção suave do vácuo entre os intervalos. Finda essa etapa, cada poço recebeu 50µl do detector de anticorpo equivalente, OPG ou RANKL e novamente a placa foi selada e permaneceu incubada por 1h no agitador à temperatura de 23^oC. Em seguida cada poço recebeu a alíquota de 50µl dos corantes ficoeritrina e streptavidina e igualmente a placa foi selada, perdurando no agitador por 30min. Todo conteúdo foi removido pelo vácuo e cada poço foi lavado por três vezes com a solução tampão, recebendo assim 100µl de fluido de revestimento (*sheath fluid*) permanecendo por apenas 5min no agitador com a finalidade de ressuspender as microesferas.

Após as etapas de hibridização e marcação, a placa foi posicionada no equipamento Luminex[®] para a contagem das microesferas e quantificação da fluorescência emitida pela ficoeritrina. O valor mediano da intensidade da fluorescência (MFI), com base na equação das médias dos padrões diluídos, foi calculado pelo *software* do equipamento empregando o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn com nível de significância de 5%.

4.2.10 Aspectos éticos

Todos os fragmentos ósseos colhidos para esse estudo foram previamente autorizados para uso, através da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFF sob o n^o232/08 (CAAE n^o 01810258000-08), com o cuidado ético em manter em sigilo o nome dos pacientes envolvidos na pesquisa.

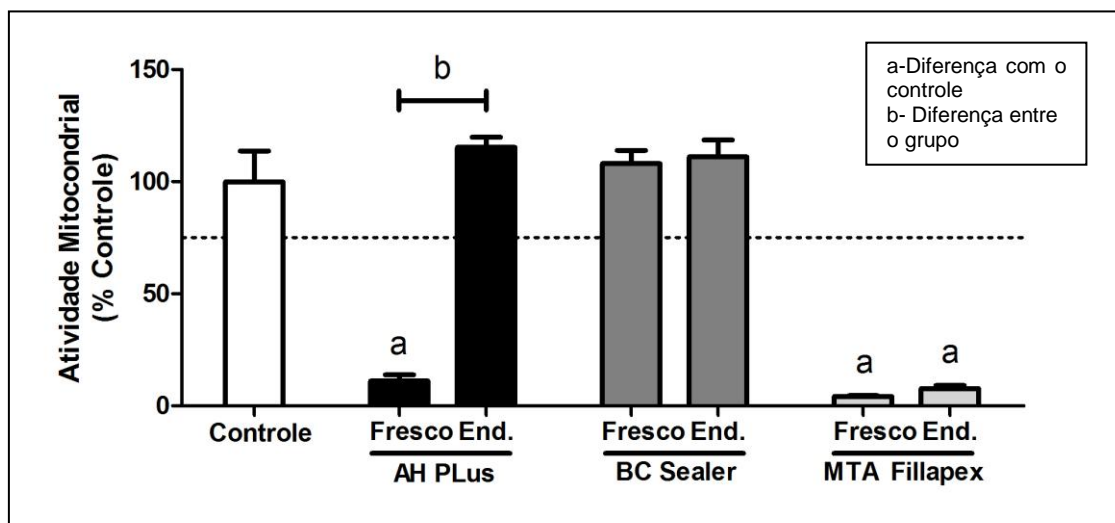
5 RESULTADOS

5.1 Resultados do teste multiparamétrico (*Kit in cytotoxic*®)

5.1.1 Resultados do teste com hidróxido de tetrazólio (XTT)

A figura 8 representa o gráfico da quantificação em percentual da viabilidade das células pela atividade mitocondrial, que foram expostas por 24h aos extratos dos cimentos obturadores logo após as suas manipulações (fresco) e após o endurecimento (end.).

Figura 8 - Representação gráfica do efeito citotóxico sobre os osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos



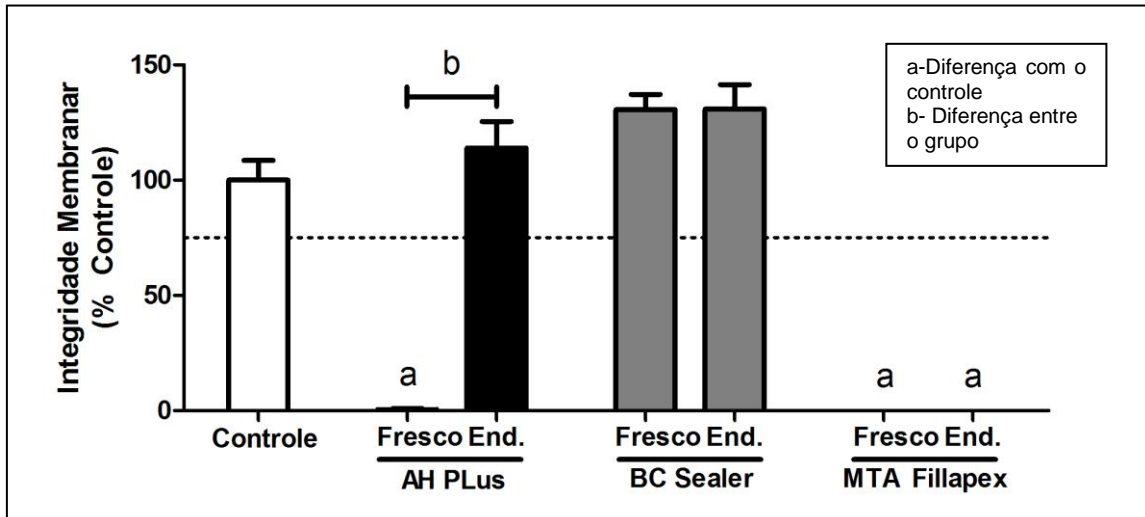
Fonte: A autora, 2012.

5.1.2 Resultados do teste com vermelho neutro (NR)

A figura 9 representa o gráfico da quantificação em percentual da viabilidade das células pela integridade da membrana celular, que foram expostas por 24h aos

extratos dos cimentos obturadores logo após as suas manipulações (fresco) e após o endurecimento (end.).

Figura 9 - Representação gráfica do efeito citotóxico sobre os osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos

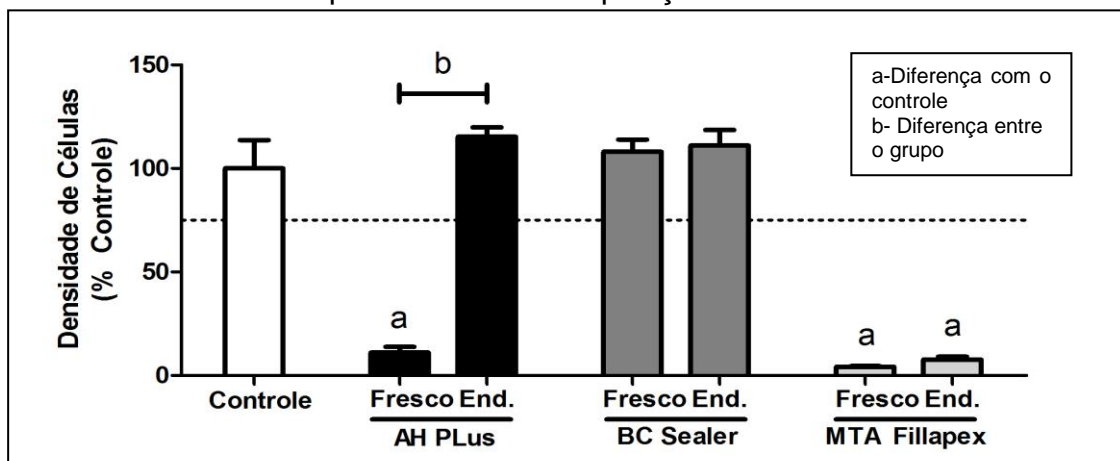


Fonte: A autora, 2012.

5.1.3 Resultados do teste com cristal violeta

A figura 10 representa o gráfico da quantificação em percentual da viabilidade das células pela densidade celular, que foram expostas por 24h aos extratos dos cimentos obturadores logo após as suas manipulações (fresco) e após o endurecimento (end.).

Figura 10 - Representação gráfica do efeito citotóxico sobre os osteoblastos humanos após 24 horas de exposição aos extratos dos cimentos



5.1.4 Análise dos resultados do teste multiparamétrico

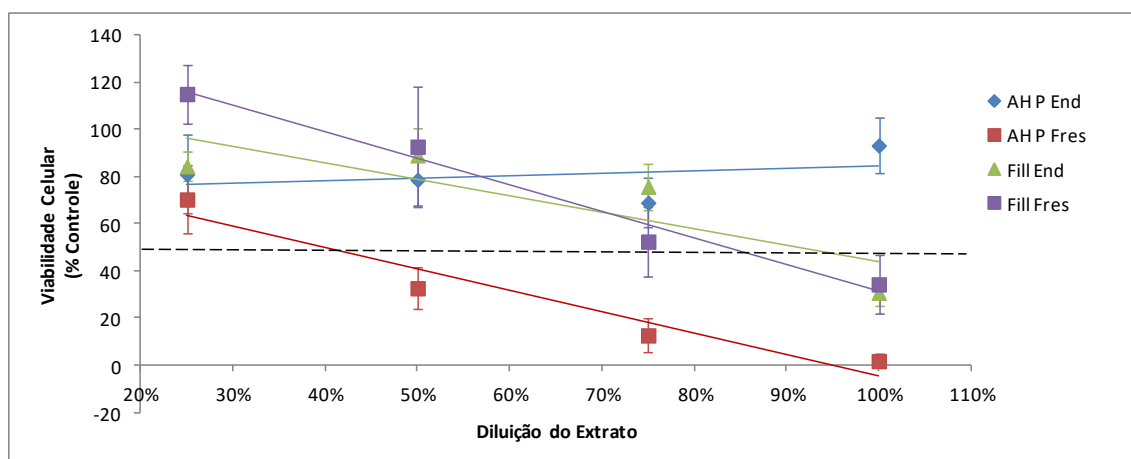
De posse dos resultados obtidos, procedeu-se a análise estatística onde buscou-se verificar a influência do tipo e do estado físico dos cimentos na viabilidade celular para todas os três parâmetros utilizados nessa metodologia. A hipótese nula foi rejeitada, para um nível de confiança de 95% pois o grupo exposto ao cimento AH Plus demonstrou ser significativamente ($p > 0,05$) mais tóxico logo após a manipulação (fresco) que quando endurecido (b), assim como quando comparado ao controle negativo (a) nos três parâmetros avaliados, com discreta sensibilidade para o teste com vermelho neutro (permeabilidade da membrana). O grupo do MTA Fillapex foi citotóxico em ambas as condições experimentais (a) nos três parâmetros avaliados e, também, com leve sensibilidade para o vermelho neutro. O cimento BC Sealer se comportou semelhante ao controle negativo demonstrando não ser citotóxico independente da condição experimental. O grupo controle positivo (látex) não foi descrito nos gráficos acima por apresentarem os resultados esperados com total morte celular.

5.2 **Teste IC₅₀**

De posse dos resultados e após análise estatística, as curvas de viabilidade celular dos cimentos endodônticos pela análise da concentração do extrato que induziu 50% de lise ou morte celular (IC_{50%}) após o contato com os extratos dos cimentos por 24h, utilizando o teste XTT (*Kit in cytotoxic®*), foram criadas e apresentadas pela representação gráfica na figura 11. A hipótese nula foi rejeitada, para um nível de confiança de 95% onde observamos que o cimento AH Plus quando endurecido (AHP End) não mudou significativamente seu comportamento quando diluído demonstrando boa compatibilidade com as células utilizadas, diferencialmente quando recém-manipulado (AHP Fres), que só expressou boa compatibilidade a partir da média de diluição em 40%. Em contrapartida, o cimento MTA Fillapex apesar do seu comportamento citotóxico inicial, em ambas as condições experimentais foram linearmente mudando sua representação a partir da

média de diluição de 95% (Fill End) e 85% (Fill Fres). O cimento BC Sealer não participou dessa análise pela exclusão no teste multiparamétrico.

Figura 11 - Representação gráfica da dose do extrato dos cimentos correspondente ao índice de citotoxicidade que induziu 50% de lise ou morte celular ($IC_{50\%}$)



Legenda: AH P End = AH Plus após o endurecimento; AH P Fres= AH Plus após a manipulação; Fill End= MTA Fillapex após o endurecimento e Fill Fres= MTA Fillapex após a manipulação.

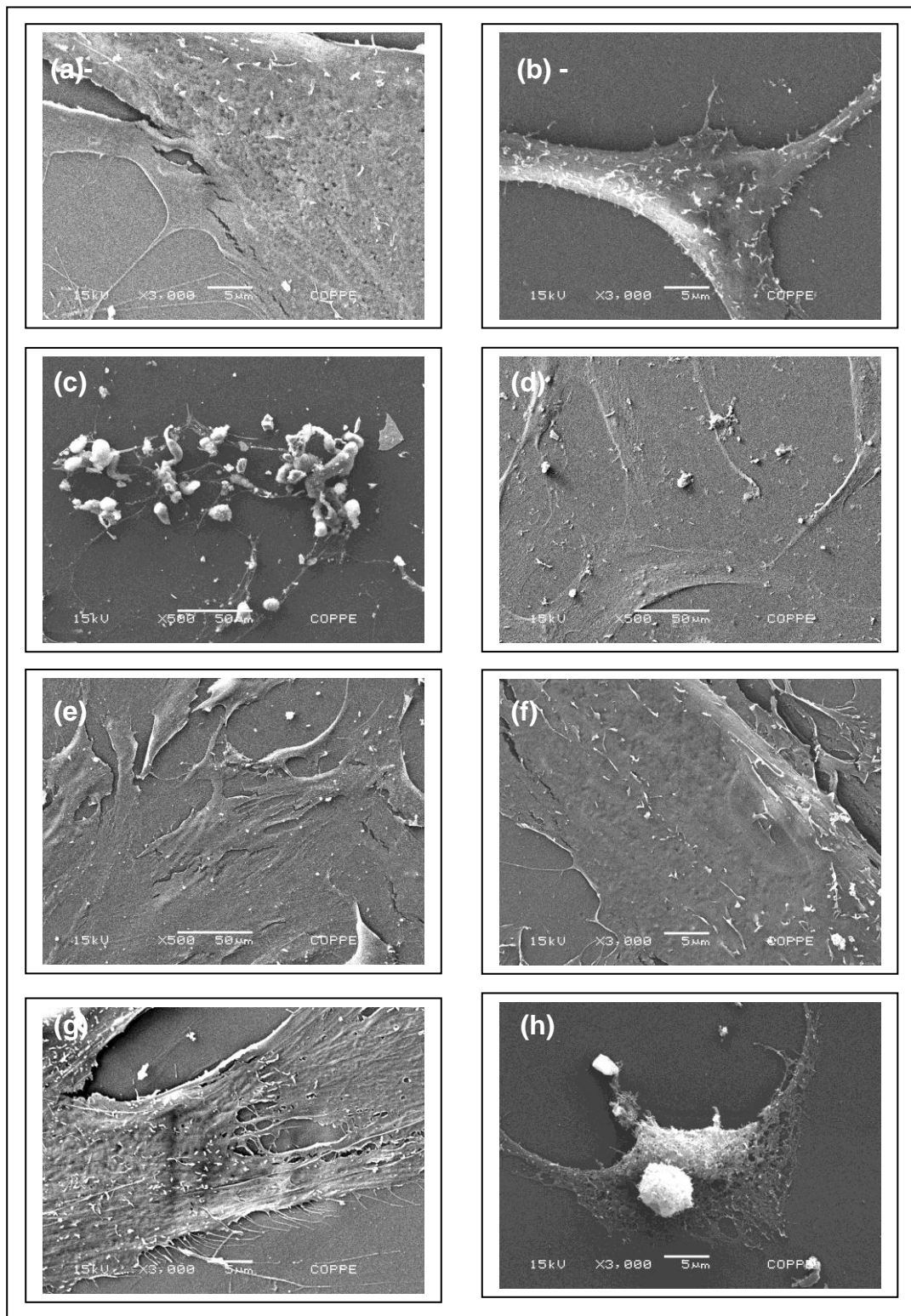
Fonte: A autora, 2012.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise das culturas de osteoblastos em microscopia eletrônica de varredura mostrou que existe uma grande diferença, tanto em relação à adesão quanto à morfologia celular, entre o grupo controle negativo e os alguns grupos que foram expostos aos cimentos endodônticos (Figuras 12 (a) a (h)). No grupo controle negativo as células apresentaram-se espaiadas, aderentes podendo observar comunicação entre elas (Figuras 12 (a) e (b)). Nas culturas expostas ao cimento AH Plus, logo após a manipulação (fresco), as células perderam a morfologia original, além da falta de aderência (Figura 12 (c)), entretanto quando em contato com esse cimento no estágio endurecido as células permaneceram com suas características originais (Figura 12 (d)),. Para os grupos expostos ao cimento BC Sealer, tanto após a manipulação quanto após o endurecimento, as células se mantiveram espaiadas e com adesão semelhante ao grupo controle (Figuras 12 (e) e (f)). O cimento MTA

Fillapex, tanto após a manipulação quando endurecidos, alteraram a morfologia e a adesividade dos osteoblastos (Figuras 12). O grupo controle positivo (látex) não está demonstrado na figura que segue por razões óbvias de alterações morfológicas.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura demonstrando os e na morfologia celular dos osteoblastos nos grupos controle negativo e experimentais



Legenda: (a) e (b) controles negativo; (c) AH Plus após a manipulação; (d) AH Plus após o endurecimento; (e) BC Sealer após a manipulação; (f) BC Sealer após o endurecimento; (g) MTA Fillapex após a manipulação; (h) MTA Fillapex após o endurecimento

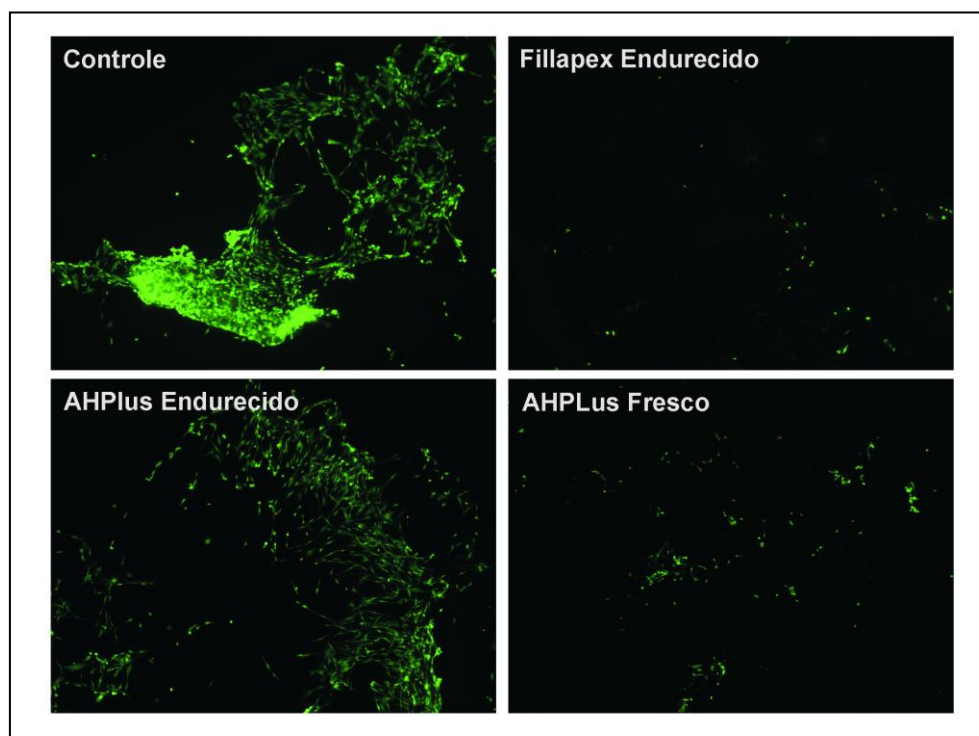
Nota: aumento 500X e 3000X, indicado na película.

Fonte: A autora, 2012.

5.4 Microscopia de fluorescência

Os efeitos dos cimentos AH Plus e MTA Fillapex sobre a cultura de osteoblastos avaliados pela incorporação do fluoróforo diacetato de carboxifluoresceína em microscópio invertido para epifluorescência (filtro ultravioleta de excitação/barreira 450-490nm/515nm), pela análise qualitativa dos 10 campos de cada amostra testada encontram-se representados na figura 13. O cimento AH Plus no estágio endurecido se comportou semelhante ao controle de células que não foram expostas (controle negativo) entretanto, quando em contato com as células logo após a manipulação (fresco) seu comportamento foi notoriamente tóxico, situação essa que foi equivalente para o cimento MTA Fillapex nos dois estágios empregados. O cimento BC Sealer não participou dessa análise pela exclusão no teste multiparamétrico.

Figura 13 - Microscopia de epifluorescências, mostrando o resultado qualitativo de um campo representativo das células viáveis coradas pela carboxifluoresceína (fluorescência verde), após o contato por 24h com os extratos dos cimentos estudados



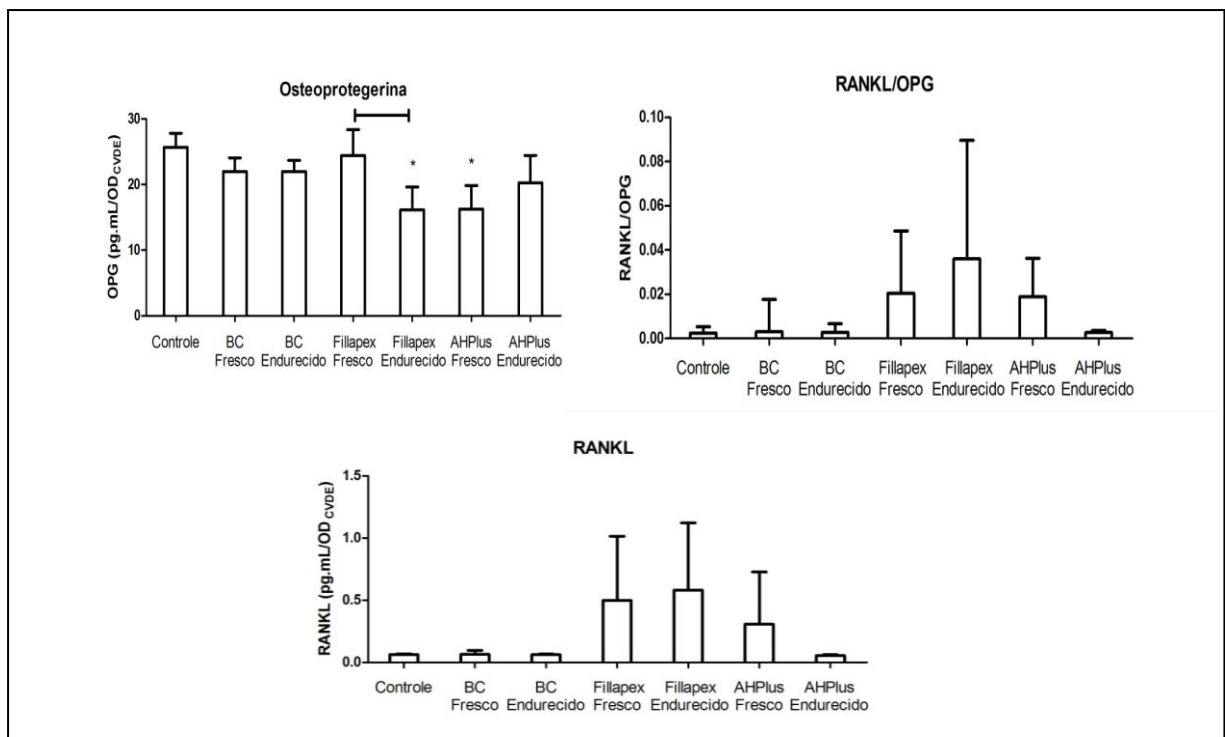
Nota: aumento 20X.

Fonte: A autora, 2012.

5.5 Citometria de fluxo pela tecnologia do Luminox

De posse dos resultados e após a análise estatística, o teste pela citometria de fluxo para os painéis humanos da osteoprotegerina e RANKL utilizando a tecnologia do Luminox[®] revelou que os cimentos MTA Fillapex quando endurecido e o AH Plus logo após a manipulação (fresco) não foram capazes de produzir OPG (*) ao nível dos grupos experimentais, assim como o cimento MTA Fillapex fresco produziu maiores níveis de OPG que quando endurecido. A estimulação de RANKL foi considerada muito baixa, não sendo expressiva para quaisquer grupos experimentais. Assim sendo, a razão entre OPG/RANKL foi abaixo de 0,01 pg/ml, o que representa que os grupos testados não foram capazes de influenciar na produção dessas proteínas que estão diretamente ligadas a osteoclastogênese (Figura 14).

Figura 14 - Representação gráfica da concentração de OPG e RANKL e razão OPG/RANKL em meio de cultura de osteoblastos expostas por 24h aos extratos dos cimentos indicados



Nota: resultados obtidos por imunoenensaio e normalizados pela densidade celular (D.O. _{CVDE}). Barras representam a média \pm DP. * indica diferença significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA). A barra horizontal representa diferença significativa entre os grupos indicados ($p < 0,05$, ANOVA).

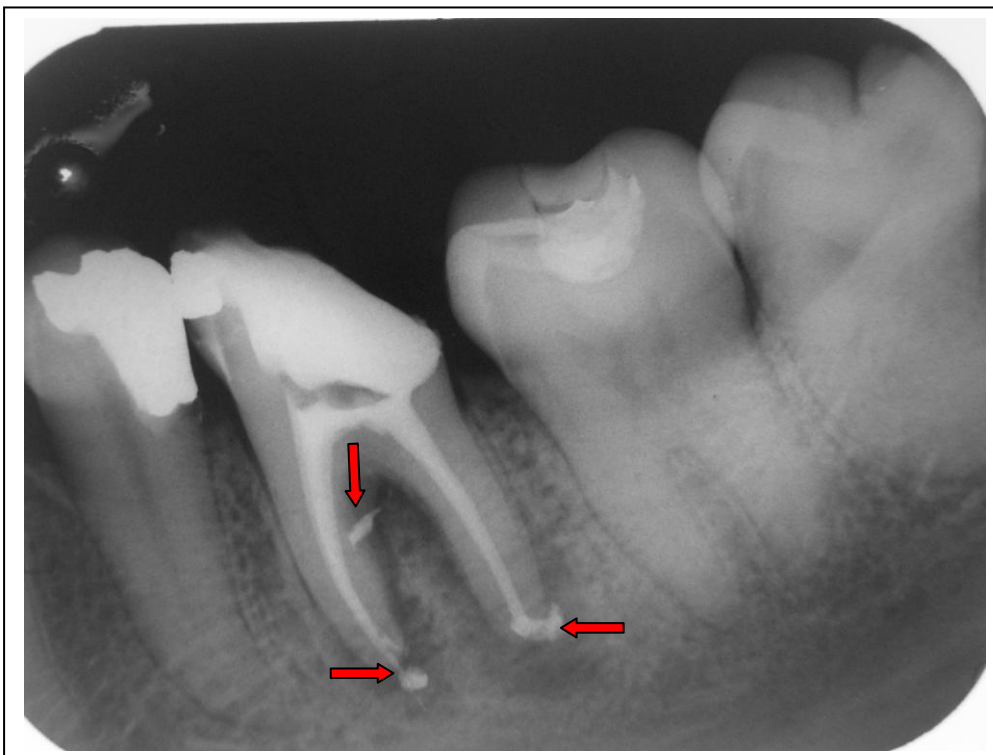
Fonte: A autora, 2012.

O detalhamento dos dados (*raw data*) para realização dos testes estatísticos das metodologias empregadas acima encontra-se discriminado na seção APÊNDICE - Resultados dos testes estatísticos.

6 DISCUSSÃO

A tentativa em alcançar um preenchimento do sistema de canais radiculares por meio de materiais biologicamente compatíveis e que preencham todo o espaço pulpar continua sendo, atualmente, a meta final da parte técnica do tratamento endodôntico. Com as práticas mais modernas de instrumentação e obturação, em algumas situações, torna-se difícil evitar um discreto extravasamento do material obturador reconhecido mundialmente como respingo (*puff*) de cimento (Figura 15). Diante disso, a necessidade de estudos mais aprofundados quanto ao comportamento biológico, sem desfavorecer às propriedades físicas e químicas, na tentativa de encontrar algum cimento obturador que venha contribuir ou pelo menos não interferir no processo de reparo dos tecidos perirradiculares vem sendo alvo de muitos estudos.

Figura 15 – Caso clínico do elemento 36 mostrando alguns *puffs* de cimento endodôntico: setas



Nota: consultório particular da autora da tese.
Fonte: A autora, 2012.

Diversas metodologias podem ser empregadas na avaliação da citotoxicidade *in vitro* em materiais odontológicos. Nesse trabalho, associamos técnicas já amplamente utilizadas (GUIGAND et al., 1999; HUANG et al., 2002; HO, HUANG; CHANG 2006; ELDENIZ et al., 2007; XU et al., 2010; CHANG et al., 2010; MAEDA et al., 2011; ZOUFAN et al., 2011; SALLES et al., 2012) com um estudo pioneiro em torno de painéis ósseos humanos envolvidos com a osteoclastogênese empregando a tecnologia do Luminex[®]. As tendências em novas tecnologias para o diagnóstico laboratorial estão voltadas para esses tipos de testes, que permitam a detecção simultânea de diversas proteínas ou patógenos como os testes com ácidos nucléicos, imunoenaios e ensaios enzimáticos, em grande número de amostras e que sejam de simples execução, potencialmente automatizáveis e que forneçam ainda resultados em um curto período de tempo. Associadas a essas características, esse tipo de ensaio é sensível e específico o que possibilita o diagnóstico precoce e diferencial para o alvo estudado, justificando dessa forma o uso de uma tecnologia que até então é pouco utilizada em pesquisa odontológica (THORMAN et al., 2010).

Este estudo é o primeiro a demonstrar a influência dos cimentos endodônticos em painel humano utilizando a tecnologia do Luminex[®] modulando a expressão de OPG e RANKL nas células de linhagem osteoblásticas. Os resultados sugerem que, para os cimentos estudados, não houve impacto na estimulação ou no impedimento da osteoclastogênese. Segundo o estudo de Luvizuto et al. 2010, o processo de reparo ósseo é um interessante modelo para estudarmos a dinâmica do tecido ósseo, pois representa um processo que envolve várias etapas celulares, iniciando-se pela proliferação fibroblástica, principalmente, a partir do ligamento periodontal, originando um tecido conjuntivo sobre o qual ocorre a deposição de cálcio, levando à formação de trabéculas ósseas, que preencherão o alvéolo sendo que, o balanço entre RANKL/OPG é que irá determinar a ação combinada das funções dos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos fato esse que já também citado por Kwan et al. 2004.

Toda a pesquisa seguiu as normas estabelecidas pela ISO 10993 que essencialmente melhora a reprodutibilidade, resultando em uma melhor base para comparação entre os dados obtidos a partir de diferentes laboratórios. No entanto, a padronização também significa que a seleção de testes e da substância, por vezes, são métodos muito específicos para problemas científicos e podem não serem incluídos como um padrão, porém se os testes não seguirem alguma normatização

razões apropriadas devem ser dadas para justificar o emprego de diferentes metodologias (SCHMALZ, 1994).

Reconhecemos que apesar das limitações de trabalharmos *in vitro* com culturas celulares (SCHMALZ 1994; DE-DEUS et al., 2012), por serem modelos muito simplificados pois excluem a complexidade das regulações vasculares, nervosas e hormonais do organismo e que os mecanismos de reparação de lesões, que necessitam de cooperações celulares complexas, não é evidente para esse tipo de cultura, podemos citar que as culturas têm a vantagem de satisfazer as exigências da ética da vida dos animais de laboratório e as culturas primárias parece ser mais aplicáveis pois vão interagir com esse tipo de células quanto utilizada *in vivo* (ROSA; BELOTI 2003).

Schmalz (1994) enfatizou também que os dados *in vitro* podem ainda ser utilizados para a caracterização da atividade biológica de um novo material, assim como um novo material pode ser caracterizado por vários testes físicos. Esses achados, baseados em características físicas, químicas e biológicas de dados podem ser usados para estimar o comportamento de um novo material no paciente por um especialista, tal como recomendado pelo ISO 10993-24. A partir deste ponto de vista, os dados de ensaios biológicos *in vitro* são tão valiosos como aqueles a partir de testes físicos. E ainda, os dados biológicos *in vitro* poderão esclarecer o mecanismo biológico no qual um efeito é produzido podendo ser investigado separadamente. Os testes *in vivo* em animais demonstram um fenômeno principalmente mas não o mecanismo por trás dele.

Um ponto interessante dessa pesquisa é o aparato experimental com tubos cônicos de polietileno com uma ponta equivalente a uma lima 80K onde uma pequena porção viabiliza a interação material/meio o que simula um canal radicular com diâmetro amplo já preparado (CARD et al., 2002), entretanto sem haver o extravasamento do material. Esse tipo de interação também foi realizada na pesquisa de Bouillaguet et al. (2006) e é alvo de alguns testes secundários (GOMES-FILHO et al., 2007; GIOVANINI et al., 2011) onde o foco é o comportamento biológico em cobaias pela implantação subcutânea de tubos de polietileno contendo cimentos endodônticos.

Os resultados apresentados nessa pesquisa mostram uma clara diferença no padrão de citotoxicidade revelada pelo cimento AH Plus, MTA Fillapex e o BC Sealer após o contato dos osteoblastos por 24h com os respectivos extratos. Comparando

a metodologia do teste multiparamétrico nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Zoufan et al. (2011) e da Silva et al. (2012); Scelza et al. (2012) e Salles et al. (2012) que mostram maior citotoxicidade para o cimento AH Plus logo após a manipulação e para o cimento MTA Fillapex respectivamente, sendo esse último também com resultados análogos para a microscopia de varredura. Esses dados confrontam justamente todos os achados em relação ao comportamento do MTA (BODRUMLU, 2008; CAMILLERI et al., 2008; DE DEUS et al., 2005; KETTERING e TORABINEJAD 1995; KIM et al., 2008; SAIDON et al. 2003; TORABINEJAD et al., 1995; ZHU et al. 2000), o que pode provar que sua formulação quando alterada para uso como cimento obturador, interferiu no padrão da citocompatibilidade. Salles et al. 2012, encontrou o mesmo padrão aqui relatado e justificou que a citotoxicidade do MTA Fillapex foi provavelmente relacionado à presença de resina ou à liberação de arsênio, um metal pesado, que reage com tióis protéicos. Os autores acrescentam ainda que a exposição a altas concentrações deste componente pode induzir a genotoxicidade.

Outra importante característica do presente desenho experimental é o uso de uma metodologia multiparamétrica com o XTT, que possui duas vantagens em relação ao tradicional MTT: é mais sensível e a reação resulta em uma tintura solúvel de formazano o que elimina uma etapa final de solubilização, a qual significa menor manipulação e conseqüentemente reduzido risco de erros (STEVENS; OLSEN, 1993).

No presente trabalho optou-se por testar dois novos cimentos endodônticos que estão sendo alvo das mais recentes pesquisas (ZHANG, LI; PENG, 2009; HESS et al., 2011; LOUSHINE et al., 2011; SHOKOUHINEJAD et al., 2011; WILLERSHAUSEN et al., 2011; SALLES et al., 2012; SCELZA et al., 2012) e comparar com o cimento AH Plus que já é amplamente aceito pela comunidade científica. Apesar dos dados já descritos, é necessário considerar que os cimentos BC Sealer e MTA Fillapex são produtos novos e como ainda não existem resultados na literatura conflitantes ou semelhantes aos encontrados nessa pesquisa, o desenvolvimento de novos estudos, poderá, no futuro, não só consolidar melhor esses efeitos, como também oferecer aos clínicos novas opções de escolha.

7 CONCLUSÃO

A sensibilidade dos testes utilizados para a citotoxicidade foi semelhante, entretanto a nova formulação do cimento endodôntico biocerâmico, BC Sealer, foi o único grupo que, *in vitro*, não demonstrou citotoxicidade. Nenhum dos materiais testados contribuiu para a osteoclastogênese.

REFERÊNCIAS

- ADAMOPOULOS, O.; PAPADOPOULOS, T. Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 18, n. 8, p. 1587–97, Aug. 2007.
- AMERICAN DENTAL ASSOCIATION/AMERICAN NATIONAL STANDARD;. *Specification n. 41: recommended standard practices for biological evaluation of dental materials*. Chicago, 2005.
- ARCOS, D.; IZQUIERDO-BARBA; I.; VALLET-REGÍ, M. Promising trends of bioceramics in the biomaterials field. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 20, n. 2, p. 447–55, Feb. 2009.
- ASSMANN, E; et al. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *Journal of endodontics*, n. 2, p. 219–21, Feb. 2012.
- BORGES, R. P; et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International endodontic journal*, v. 45, n. 5, p. 419–28, May 2012.
- BOUILLAGUET, S; et al. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *Journal of endodontics*, v. 32, n. 10, p. 989–92, Oct. 2006.
- BOYCE, B. F. ; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 473, n. 2, p. 139–46, May 2008.
- BOYLE, W. J., Simonet, W. S. ; Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, vol. 423, p. 337–342, May 2003.
- BRACKETT, M. G; et al. Comparison of seal after obturation techniques using a polydimethylsiloxane-based root canal sealer. *Journal of endodontics*, v. 32, n. 12, p. 1188–90, Dec. 2006.
- BRACKETT, M. G; et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *International endodontic journal*, v. 41, n. 12, p. 1072–8, Dec. 2008.
- CANDEIRO, G. T. D. M.; et al. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Journal of endodontics*, v. 38, n. 6, p. 842–5, Jun. 2012.
- CARD, S. J., et al. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *Journal of endodontics*, v. 28, n. 11, p. 779–83, Nov. 2002.

CHANDRAHASA, S., MURRAY, P. E. ; NAMEROW, K. N. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *Journal of endodontics*, v. 37, n. 9, p. 1236–9, Sep. 2011.

CHANG, M. C; et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *International endodontic journal*, v. 43, n. 3, p. 251–7, Mar. 2010.

COON, D.; et al. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *Journal of endodontics*, v. 33, n. 4, p. 432–6, Apr. 2007.

DA SILVA, R. A. B.; et al. B. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *Journal of endodontics*, v. 38, n. 6, p. 803–13, Jun. 2012.

De-Deus G; et al. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *Journal of endodontics*, v. 35, n. 10, p. 1387–90, Oct. 2009.

DE-DEUS, G; et al. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *International endodontic journal*, v. 45, n. 6, p. 508–13, Jun. 2012.

ELDENIZ, A U.; et al. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International endodontic journal*, . 40, n. 5, p. 329–37, May 2007.

FAN, R; et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells, *Chinese medicine Journal*, v. 124, n. 14, p. 2162–2166, 2011.

FOUAD, A. F, WALTON, R. E. ; RITTMAN, B. R. Healing of induced periapical lesions in ferret canines. *Journal of endodontics*, v. 19, n. 3, p. 123–9, Mar. 1993.

FRIEDMAN, C. D.; et al. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *Journal of biomedical materials research*, v. 43, n. 4, p. 428–32, Jan. 1998.

FUKADA, S. Y; et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral microbiology and immunology* , v. 24, n. 1, p. 25–31, Feb. 2009.

GENCOGLU, N; et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta histochemica*, v. 112, n. 6, p. 567–75, Nov. 2010.

GIOVANINI, A. F; et al. An endodontic sealer induces a pathological condition when associated with persistent tissue toxicity and presence of myofibroblasts. *Brazilian dental journal*, v. 22, n. 5, p. 369–76, Jan. 2011.

GOMES FILHO, J. E.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. *Journal applied of oral science*, v. 15, n. 3, p.186-194, may./jun. 2007.

GOMES-FILHO, J. E; et al. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *Journal of endodontics*, v. 35, n. 11, p. 1577–9, Nov. 2009.

GROSSMAN, L. I. Endodontic Practice. 8 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974. p. 299-300.

GUIGAND, M.; et al. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *Journal of endodontics*, v. 25, n. 6, p. 419–23, Jun. 1999.

HAMMAD, M., QUALTROUGH, A.; SILIKAS, N. Evaluation of root canal obturation: a three-dimensional in vitro study. *Journal of endodontics*, v. 35, n. 4, p. 541–4, Apr. 2009.

HENCH, L. L. The story of Bioglass. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 17, n. 11, p. 967–78, Dec. 2006.

HESS, D., SOLOMON, E., SPEARS, R.; HE, J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *Journal of endodontics*, v. 37, n. 11, p. 1547–9, Nov. 2011.

HIRAI, V. H. G; et al. Comparative analysis of leakage in root canal fillings performed with gutta-percha and Resilon cones with AH Plus and Epiphany sealers. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 109, n. 2, p. e131–5, Feb. 2010.

HO, Y. C., HUANG, F. M.; CHANG, Y. C. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *International endodontic journal*, v. 39, n. 5, p. 389–93, May 2006.

HUANG, F.; et al. Induction of c-fos and c-jun protooncogenes expression by formaldehyde-releasing and epoxy resin-based root-canal sealers in human osteoblastic cells. *Journal of biomedical material research*, v. 59, n. 3, p 460-5, Mar. 2001.

HUANG, F. M.; et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International endodontic journal*, v. 35, n. 2, p. 153–8, Feb. 2002.

HUANG, T. H.; et al. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*, v. 23, n. 1, p. 77–83, Jan. 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *N. 10993 Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, Geneva, 2009.

- JIANG, J; et al. Quantitative analysis of osteoclast-specific gene markers stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of endodontics*, v. 32, n. 8, p. 742–6, Aug. 2006.
- KARAPANOU, V., KEMPURAJ, D.; THEOHARIDES, T. C. Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis. *Journal of endodontics*, v. 34, n. 2, p. 148–51, Feb. 2008.
- KAWASHIMA, N; et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 103, n. 5, p. 707–11, May 2007.
- KOCH D.; BRAVE. D. Bioceramic technology – the game changer in endodontics. *Endodontic practice*, Apr. 2009
- KOMATH M.; VARMA H. K. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications. *Bulletin of Material Science*, v. 26, n. 4, p. 415–422, June 2003.
- KWAN T. S.; et al. IL-6 RANKL TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 15, n. 1, p. 49–60, Feb. 2004.
- LEYHAUSEN, G.; et al. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *Journal of endodontics*, v. 25, n. 2, p. 109–13, Feb. 1999.
- LODIENE, G.; et al. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *International endodontic journal*, v. 41, n. 1, p. 72–7, Jan. 2008.
- LOUSHINE, B. a et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Journal of endodontics*, v. 37, n. 5, p. 673–7, May 2011.
- MAEDA, H; et al. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. *International endodontic journal*, v. 44, n. 5, p. 425–31, May 2011.
- MENEZES, R; et al. Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 102, n. 3, p. 404–9, Sep. 2006.
- MENEZES, R; et al. Differential patterns of RANKL/OPG expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *Journal of endodontics*, v. 34, n. 8, p. 932–938, Aug. 2009.
- MERDAD, K.; et al. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *Journal of endodontics*, v. 33, n. 1, p. 24–7, Jan. 2007.
- METZGER, Z.; et al. The quality of root canal preparation and root canal obturation in canals treated with rotary versus self-adjusting files: a three-dimensional micro-computed tomographic study. *Journal of endodontics*, v. 36, n. 9, p. 1569–73, Sep. 2010.

MILETIĆ, I; et al. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endodontics & dental traumatology*, v. 16, n. 6, p. 287–90, Dec. 2000.

LUVIZUTO, R.; et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Archives of oral biology*, v. 55, n. 1, p. 52–9, Jan. 2010.

NAIR, U; et al. A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 112, n. 2, p. e74–7, Aug. 2011.

NUNES, V. H.; et al. Adhesion of Epiphany and AH Plus sealers to human root dentin treated with different solutions. *Brazilian dental journal*, v. 19, n. 1, p. 46–50, Jan. 2008.

OBID: Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index.php?id_conteudo=11443&rastro=PESQUISAS+E+ESTAT%C3%8DSTICAS%2FConceitos+Estat%C3%ADsticos/Teste+de+Hip%C3%B3teses+e+P-valor>. Acesso em 23 de abril de 2012.

OLIVEIRA, S. H. P, SANTOS, V. A. C. Studies on the Expression of Fibroblast Growth Factor-2 from Odontoblast-like Cells, *Journal of endodontic*, v. 37, n 11, Nov. 2011.

OWEN M. E., CAVÉ J.; JOYNER C. J. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F, *Journal of cell science*, v. 87, p. 731–8, Jun. 1987.

PARFITT, A. M. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metabolic bone disease & related*, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1982.

PERTOT W. J; et al. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, v. 73, n. 5, p. 613-20, May 1992.

RICKERT, U.G. The management of pulpless teeth from both the clinical and laboratory standpoint. *Dental cosmos*, v. 67, n. 7, p. 635-42, July 1925.

RICUCCI, D. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 1. Literature review. *International endodontic journal*, v. 31, n. 6, p. 384–93, Nov. 1998.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *Journal of endodontics*, v. 36, n. 1, p. 1–15, Jan. 2010.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Brazilian dental journal*, v. 14, n. 1, p. 16–21, Jan. 2003.

- SAKATA, M; et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for bone and mineral research*, v. 14, n. 9, p. 1486–92, Sep. 1999.
- SALLES, L. P; et al. Mineral Trioxide Aggregate-based Endodontic Sealer Stimulates Hydroxyapatite Nucleation in Human Osteoblast-like Cell Culture. *Journal of endodontics*, v. 38, n. 7, p. 971–6, Jul. 2012.
- SCELZA, M. Z.; et al. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International endodontic journal*, v. 45, n. 1, p. 12–8, Jan. 2012.
- SCHILDER, H. Filling root canals in three dimensions. 1967. *Journal of endodontics* , v. 32, n. 4, p. 281–90, Apr. 2006.
- SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *Journal of dentistry*, v. 22 Suppl 2, p. S6–S11, Jan. 1994.
- SHA, X. J. Controlled Release of Osteoprotegerin: A Promising Supplementary Option for the Treatment of Apical Periodontitis with Large Periradicular Lesion. *Dental hypotheses*, v. 2, n. 1, p. 16–20, Feb. 2011.
- SHOKOUHINEJAD, N; et al. Push-out bond strength of gutta-percha with a new bioceramic sealer in the presence or absence of smear layer. *Australian endodontic journal*, v. 38, p. 1–6, May 2011.
- SILVA, E. J. N. L; et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *International endodontic journal*, v. 45, n. 1, p. 49–56, Jan. 2012.
- SIMONET W. S; et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, v. 89, p. 309–319, Apr. 1997.
- SOMMA, F; et al. Quality of thermoplasticized and single point root fillings assessed by micro-computed tomography. *International endodontic journal*, v. 44, n. 4, p. 362–9, Apr. 2011.
- STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of immunological methods*, v. 157, n. 1–2, p. 225–31, Jan. 1993.
- TAUBMAN, M. A.; et al. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 76, n. 11 Suppl, p. 2033–41, Nov. 2005.
- TAY J.Y.Y.; et al. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *Journal of dental research*, v. 83, n. 4, p. 349–354, Apr 2004.

- THORMAN, R.; et al. Inflammatory cytokines in saliva: early signs of metabolic disorders in chronic kidney disease. A controlled cross-sectional study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 110, n. 5, p. 597–604, Nov. 2010.
- TRUBIANI, O.; et al. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *International endodontic journal*, v. 43, n. 8, p. 646–53, Aug. 2010.
- TRUBIANI, O.; et al. Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *International endodontic journal*, v. 45, n. 1, p. 19–25, Jan. 2012.
- VERA, J.; et al. One- versus Two-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histobacteriologic Study. *Journal of endodontics*, v. 38, n. 8, p. 1040–52, Aug. 2012.
- VERNAL, R.; et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral diseases*, v. 12, n. 3, p. 283–9, May 2006.
- VIEIRA, A. R.; et al. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *Journal of endodontics*, v. 38, n. 2, p. 250–4, Feb. 2012.
- WILLERSHAUSEN, I.; et al. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & face medicine*, v. 7, p. 15, Jan. 2011.
- XU, H. H. K.; et al. Premixed calcium phosphate cements: synthesis, physical properties, and cell cytotoxicity. *Dental materials: official publication of the Academy of dental materials*, v. 23, n. 4, p. 433–41, Apr. 2007.
- XU, P.; et al. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *Journal of endodontics*, v. 36, n. 1, p. 40–4, Jan. 2010.
- YAN, P.; et al. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *International endodontic journal*, v. 36, n. 1, p. 40–4, Jan. 2010.
- YASUDA, H.; et al. Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by which OPG/OCIF Inhibits Osteoclastogenesis *in Vitro*. *Endocrinology*, v. 139, n. 3, p. 1329–1337, Mar. 1998.
- YUAN, H.; et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 38, n. 11, p. 1029–36, Nov. 2011.
- ZHANG, H.; et al. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, v. 35, n. 7, p. 1051–5, Jul. 2009.

ZHANG, W.; et al. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 107, n. 6, p. e79–82, Jun. 2009.

ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. *Journal of endodontics*, v. 36, n. 12, p. 1978–82, Dec. 2010.

ZHANG, X.; PENG, B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *Journal of endodontics*, v. 31, n. 8, p. 574–7, Aug. 2005.

APÊNDICE – Resultados dos testes estatísticos

Os números que seguem representam os resultados (*raw data*) das metodologias onde os testes estatísticos foram empregados.

Tabela 1 – Teste multiparamétrico, XTT – Porcentagem em relação ao controle

	AH e	BC e	FI e	AH f	BC f	FI f	Cel	Branco	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	168,120	137,583	33,221	28,859	107,047	2,348	86,912	0,319	480
B	102,684	147,315	6,3758	24,832	128,859	3,020	110,402	0,331	480
C	145,302	108,053	2,0134	93,624	122,818	0	95,637		480
D	118,456	143,288	5,0335	40,604	123,825	20,805	124,832		480
E	112,080	137,919			127,181	2,0134	82,214		480
	AH Plus	BC e	FI e	AH f	BC f	FI f	Cel		
media	129	135	12	47	122	6	100		
desvpad	24	14	13	28	8	8	16		

Fonte: A autora, 2012

Tabela 2 – Teste multiparamétrico, NR – Porcentagem em relação ao controle

	AH e	BC e	FI e	AH f	BC f	FI f	Cel	Branco	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	147,887	137,558	0	0	147,183	0	94,835	0,087	540
B	97,887		0	0	122,535	0	90,610	0,083	540
C		142,957	0	0	134,976	0	89,201		540
D	108,685	143,662	0	2,347	117,370				540
E	101,173	98,826	0	0		0	125,352		540
	AH e	BC e	FI e	AH f	BC f	FI f	Cel		
media	114	131	0	0	131	0	100		
desvpad	20	19	0	1	12	0	15		

Fonte: A autora, 2012

Tabela 3 – Teste multiparamétrico, CV – Porcentagem em relação ao controle

	AH e	BC e	Fi e	AH f	BC f	Fi f	Cel	Branco	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	130,254	83,140	4,618	3,695	100,692	4,157	77,1362	0,103	540
B	114,087	123,787	5,542	6,928	92,8406	5,080	86,3741	0,083	540
C	114,087	124,249	12,933	13,394	111,316	3,695	97,459		540
D	101,616	113,625	7,852	19,861	107,621	3,695			540
E	116,397	110,392	7,390	11,547	127,944	4,618	139,03		540
	AH e	BC e	Fi e	AH f	BC f	Fi f	Cel		
media	115	111	8	11	108	4	100		
desvpad	9	15	3	6	12	1	24		

Legenda: AHe= cimento AH Plus endurecido; BCe= cimento BC Sealer endurecido; Fie= cimento MTA Fillapex endurecido; AHf= cimento AH Plus fresco; BCf= cimento BC Sealer fresco; Fif= cimento MTA Fillapex fresco; cel= células

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 4 - Teste IC₅₀ de acordo os cimentos e as respectivas com as diluições

Diluições Cimentos	100%	75%	50%	25%		Controle -	0,736	0,753	0,579
AH Plus e	0,709	0,61	0,569	0,557		Controle +	0,386	0,391	0,254
	0,617	0,528	0,657	0,545		Branco	0,297	0,232	0,365
	0,59	0,566	0,619	0,664					
AH Plus f	0,317	0,316	0,385	0,618					
	0,293	0,368	0,444	0,509					
	0,236	0,359	0,449	0,593					
MTA Fillapex e	0,396	0,627	0,594	0,611					
	0,441	0,553	0,675	0,525					
	0,384	0,604	0,671	0,646					
MTA Fillapex f	0,7	0,561	0,527	0,647					
	0,797	0,648	0,6	0,427					
	0,771	0,774	0,405	0,671					

Legenda: cimento AH Plus (e = endurecido e f = fresco) e MTA Fillapex (e= endurecido e f= fresco)
Fonte: A autora, 2012.

Tabela 5 - Teste IC₅₀ médias de acordo os cimentos e as respectivas diluições

DESVPAD	100%	75%	50%	25%	só cell	látex
AH P e	0,046	0,041	0,044	0,066	0,095929	0,077694
AH P f	0,012	0,028	0,036	0,057		
Fill e	0,022	0,038	0,046	0,025		
Fill f	0,049	0,057	0,099	0,048		

equação da reta

AH P e $y = 17,99x + 68,143$ 0%
 $R^2 = 0,3069$

AH P f $y = -90,29x + 85,818$ 40,91
 $R^2 = 0,9332$

Fill e $y = -69,71x + 113,61$ 91,24
 $R^2 = 0,7081$

Fill f $y = -113,04x + 144,33$ 83,45
 $R^2 = 0,9792$

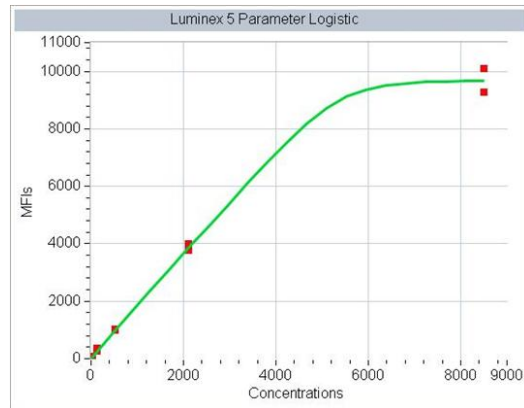
Legenda: cimento AH Plus (e = endurecido e f = fresco)
e MTA Fillapex (e= endurecido e f= fresco)

Fonte: A autora, 2012.

Figura 16 – Representação gráfica da curva padrão do painel OPG

$$\text{Logistic5p: } y = a + \frac{b}{(1 + ((x/c)^d))^{1/f}}$$

OPG



Curve Data:

$R^2 = 0.997718907901739$

Coefficient a = 5.93961477122057

Coefficient b = 9672.01641015219

Coefficient c = 5438.46328528514

Coefficient d = -10.1948376718506

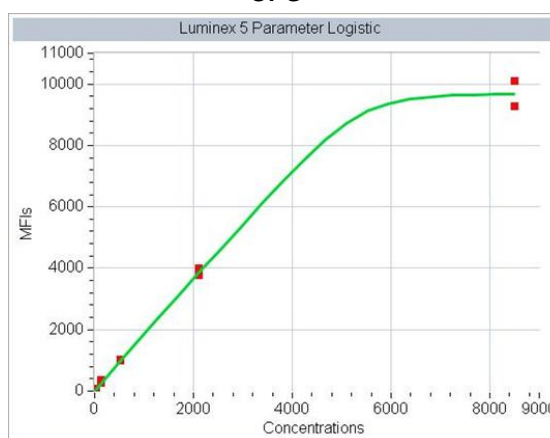
Coefficient f = 0.0957734695654218

Fonte: A autora, 2012.

Figura 17 – Representação gráfica da curva padrão do painel RANKL

$$\text{Logistic5p: } y = a + (b / (1 + ((x/c)^d)))^f$$

OPG



Curve Data:

R² = 0.997718907901739

Coefficient a = 5.93961477122057

Coefficient b = 9672.01641015219

Coefficient c = 5438.46328528514

Coefficient d = -10.1948376718506

Coefficient f = 0.0957734695654218

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 6 - Resultados para o cimento BC sealer logo após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml

BCF1	4,432.50	2.439.090
BCF2	4,799.00	2.646.496
BCF3	4,466.00	2.458.028
BCF4	4,205.50	2.310.866
BCF5	3,716.50	2.035.269

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 7 - Resultados para o cimento BC sealer após o endurecimento medidos em pg/ml

BCE1	3,494.00	1.910.162
BCE2	4,900.50	2.704.023
BCE3	4,189.50	2.301.835
BCE4	4,459.50	2.454.353
BCE5	4,211.50	2.314.253

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 8 - Resultados para o cimento MTA Fillapex logo após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml

FE1	195.00	93.519
FE2	256.00	125.552
FE3	238.00	116.077
FE4	334.50	167.057
FE5	238.50	116.340

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 9- Resultados para o cimento MTA Fillapex após o endurecimento medidos em pg/ml

FF1	195.50	93.781
FF2	264.50	130.032
FF3	191.00	91.427
FF4	229.00	111.346
FF5	193.00	92.473

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 10 - Resultados para o cimento AH Plus após a manipulação (fresco) medidos em pg/ml

AHF1	259.50	127.396
AHF2	303.50	150.634
AHF3	411.00	207.743
AHF4	435.00	220.548
AHF5	388.00	195.489

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 11 - Resultados para o cimento AH Plus após o endurecimento medidos em pg/ml

AHE1	4,145.50	2.277.005
AHE2	3,868.00	2.120.561
AHE3	4,538.50	2.499.027
AHE4	3,133.00	1.707.600
AHE5	5,244.50	2.899.300

Fonte: A autora, 2012.

Tabela 12 - Resultados para o grupo controle negativo medidos em pg/ml

C1	4,304.00	2.366.483
C2	4,781.00	2.636.298
C3	4,392.50	2.416.482
C4	5,254.50	2.904.984
C5	4,580.00	2.522.504

Fonte: A autora, 2012.