

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**CITOTOXICIDADE DE MEDICAÇÕES INTRACANAIS
EM FIBROBLASTOS L929**

Aracaju-SE
Fev/2014

MICHELLE DE PAULA FARIAS

**CITOTOXICIDADE DE MEDICAÇÕES INTRACANAIS
EM FIBROBLASTOS L929**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Aracaju-Se
2014

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

A Deus por toda proteção, força e inspiração concedidas.

A minha mãe, que sempre foi uma pessoa muito estudiosa e responsável, com certeza, onde estiver, está orgulhosa por me ver conquistando mais essa etapa da minha vida.

Ao meu pai, por incentivar sempre o meu aperfeiçoamento e crescimento profissional.

Ao meus pequenos irmãos José e Joana pela alegria e total energia transmitidos durante os 24 meses de realização desse curso. Em especial, a minha irmã Mônica, que mesmo morando em outro estado, sempre me ajudou, ouvindo minhas angústias e alegrias. Amo muito vocês!

Ao meu noivo Benjamim, que sempre foi meu porto seguro, presente em todos os momentos da minha vida (inclusive ficando comigo nos finais de semana até de madrugada no laboratório e sem reclamar!). Quero realmente te agradecer, Amor, sem você essa caminhada teria sido muito mais árdua. Te amo!

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro, pela paciência, conhecimentos transmitidos e exemplo de humanidade para com os pacientes.

Ao Prof. Dr. Adriano Augusto Melo de Mendonça, pela tranquilidade, conhecimento, atenção e disponibilidade transmitidos durante todo o curso.

Aos Prof. Dr. Wilton Mitsunari Takeshita e Dr. André Luis Faria e Silva pela ajuda (aliás, mais que ajuda!) na realização da parte mais difícil da dissertação: a estatística.

Ao Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Molecular do HU/UFS e permitido que essa pesquisa pudesse ser realizada.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular do HU/UFS, em especial, as doutorandas Luana e Fabrícia por todo empenho e paciência do mundo em me explicar como tudo funcionava, me orientando desde a compra dos materiais até a leitura das placas. Foram vários momentos e telefonemas para saber se as células estavam fungadas ou não, não é verdade? Muito obrigada!

A graduanda Nayane e o mestrando Gustavo pela colaboração para a execução de toda a metodologia, deixando suas vidas, profissional e pessoal, para auxiliar-me em horários inconvenientes. Obrigada!

A todas as turmas da disciplina de Endodontia e do Projeto de Extensão da UFS que me deram a oportunidade de conhecer a vida acadêmica, agora de um novo ângulo, como mestranda.

Aos meus amigos do curso de Mestrado pelo carinho, amizade e apoio recebidos. O percurso foi longo e pedregoso, mas chegamos ao final, todos com o título de VENCEDORES. Parabéns!!!!

Meu muito OBRIGADA!

RESUMO

As medicações intracanaais são substâncias utilizadas no tratamento endodôntico que necessitam apresentar biocompatibilidade com os tecidos perirradiculares, de modo a não causar danos teciduais e nem interferir no processo de reparo. O estudo objetivou avaliar a citotoxicidade de medicamentos de uso endodôntico, quando em contato com células fibroblásticas de murinos L929, em diferentes períodos de observação. Para avaliar a citotoxicidade, foram utilizadas três medicamentos e três veículos, divididos em sete grupos experimentais, a saber: hidróxido de cálcio-paramonoclorofenol canforado-glicerina (HPG); iodofórmio-glicerina (IG); hidróxido de cálcio-iodofórmio-água destilada (HCI); iodofórmio-água destilada (IA); hidróxido de cálcio-água destilada (HC); Otosporin® (OT) e grupo controle - composto por células e meio de cultura. Foram preparados os eluatos das medicações sendo estes colocados em contato com as células (1×10^5 células/poço) por períodos de 24h, 48h, 72h, 5 e 7 dias. Após cada tempo experimental, foi executado o ensaio colorimétrico, utilizando o reagente metiltetrazólio (MTT) e a leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro utilizando a densidade óptica de 570nm. Os dados foram tabulados e submetidos a análise por meio da ANOVA-Tukey, com um nível de significância de 5%. Em 24h, IG e OT ($P < 0,001$) demonstraram maior citotoxicidade, fato este também observado pelo grupo OT ($P < 0,001$) quando analisado em 48h. Em 72h, pôde-se observar que os grupos HC e OT foram mais citotóxicos quando comparados ao grupo controle. Estes resultados também foram demonstrados nos grupos HPG, IA, HC e OT em 5 dias. Em 7 dias todas as medicações apresentaram citotoxicidade, porém o grupo OT mostrou-se mais citotóxico ($P < 0,001$). Com relação ao fator tempo experimental, foi observado em todos os grupos diferença significativa entre 24h e 7 dias. Conclui-se que todas as medicações apresentaram citotoxicidade em algum momento da pesquisa sendo o Otosporin® a medicação intracanal mais citotóxica e, que o tempo influenciou na citotoxicidade de todas medicações analisadas.

Descritores: Citotoxicidade; Endodontia; Hidróxido de cálcio; Iodofórmio; Fibroblastos.

ABSTRACT

Intracanal dressings are substances used during endodontic treatment and requiring biocompatible with periradicular tissues, not causing tissue damage or interfere in repair process. This study aimed to assess the cytotoxicity of endodontic dressing when in contact with L929 mouse fibroblast cells, after different periods. To assess the cytotoxicity of three intracanal dressings and three vehicles were divided into seven groups, namely: calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol/ glycerin (CPG); iodoform/ glycerin (IG); calcium hydroxide/iodoform/distilled water (CIW); iodoform/distilled water (IW); calcium hydroxide/distilled water (CW); Otosporin® (OT); and control group. The eluates of the medications were prepared and placed in contact with the cells (1×10^5 cells/well) during periods of 24, 48, 72hours, 5 and 7 days. After each evaluation time, a colorimetric assay was conducted using methyl tetrazolium reagent (MTT) and the reading of the plates was performed in a spectrophotometer with optical density of 570 nm. Data were tabulated and subjected to statistical analysis by ANOVA-Tukey test with a significance level of 5%. At 24hours, IG and OT ($P < 0.001$) showed greater cytotoxicity, as also observed by the OT group ($P < 0.001$) when analyzed in 48hours. In 72 hours, it could be observed that the CW and OT groups were more cytotoxic compared to the control group. These data were also demonstrated in groups CPG, IW, CW and OT in 5 days. Within 7 days all drugs showed cytotoxicity, but OT group showed the most cytotoxic ($P < 0.001$). With respect to experimental time factor was observed in all groups significant differences between 24hours and 7 days. It is concluded that all medications showed cytotoxicity at some point in the research being Otosporin ® the most cytotoxic and that time influenced the cytotoxicity of all medications analyzed intracanal medication.

Keywords: Cytotoxicity; Endodontics; Calcium hydroxide; Iodoformium; Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manipulação da pasta de hidróxido de cálcio-água destilada.	33
Figura 2. Manipulação da pasta de iodofórmio-glicerina.	33
Figura 3. Preparação dos eluatos das medicações intracanaís na placa de cultura de 24 poços.	34
Figura 4. Placa de cultura de 96 poços contendo células fibroblásticas L929, reagente MTT e meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal.	36
Figura 5. Remoção da solução de MTT e visualização da coloração azul no fundo dos poços.	37
Figura 6. Aparelho agitador de microplacas com a placa de cultura de 96 poços com isopropanol acidificado com HCL 0,04M/l.	37
Figura 7. Placa de cultura de 96 poços com cristais de formazan dissolvidos.	38
Figura 8. Leitura da placa de cultura de 96 poços no espectrofotômetro.	38
Figura 9. Relação valores de absorbância x tempos experimentais.	41

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Descrição dos grupos e das dosagens das medicações intracanaais.	32
Tabela 1. Resultados de citotoxicidade em média (DP) expressa em unidades de absorbância.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus centígrado
®	Marca registrada
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
%	Porcentagem
π	Letra grega pi
BrdU	5-bromo-29-deoxyuridine
Ca ²⁺	Cálcio
cm ²	Centímetro quadrado
cm ² /mL	Centímetro quadrado por mililitro
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
h	Altura
hGF	Células fibroblásticas gengivais humanas
HCT20	Solução de hidróxido de cálcio e lauril sulfato de sódio
HPG	Hidróxido de cálcio-paramonoclorofenol canforado-glicerina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
ISO	<i>International Organization of Standardization</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mg/mL	Miligramas por mililitros
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros

mM	Milimolar
MMP	Matrix metaloproteinase
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTAD	Doxiciclina-ácido cítrico-detergente Tween 80
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolio
M/l	Molar por litro
nm	Nanômetro
OH ⁻	Hidroxila
P.A	Pró-análise
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogênico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
r	Raio
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SCR	Sistema de canais radiculares
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
THP-1	Células monócitos
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
U2OS	Linhagem de células osteoblástica humanas
V	Volume
WST	2-(2-methoxi-4-nitrofenil)-2H-tetrazolio
XTT	Sódio 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)- Carbonil]-2H-tetrazolio

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão de Literatura	14
2.1 Biocompatibilidade	14
2.2 Medicação Intracanal	14
2.2.1 Hidróxido de cálcio P.A	15
2.2.2 Iodofórmio	16
2.2.3 Otosporin®	16
2.2.4 Veículos	17
2.3 Cultura de Células	18
2.4 Testes de Citotoxicidade	19
2.5 Pesquisas de Citotoxicidade de Medicamentos Intracanaís	20
3. Proposição	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. Metodologia	27
4.1 Delineamento Experimental	27
4.1.1 Tipo de Estudo	27
4.1.2 Variáveis	27

4.1.3 Local da pesquisa	27
4.2 Materiais e Equipamento Utilizados	28
4.3 Procedimentos Laboratoriais	29
4.3.1 Descongelamento das Células	29
4.3.2 Cultivo das Células	30
4.3.3 Plaqueamento	31
4.3.4 Divisão dos Grupos Experimentais	31
4.3.5 Preparo dos Corpos de Prova e dos Eluatos	32
4.3.6 Contato das Células com os Eluatos	35
4.3.7 Teste de Citotoxicidade	35
4.4 Avaliação dos Dados e Análise Estatística	39
5. Resultados	40
6. Discussão	43
7. Conclusão	47
Referências	48

1 INTRODUÇÃO

O avanço técnico-científico dos instrumentos endodônticos, das técnicas de preparo, das substâncias irrigantes, dos medicamentos intracanaís e dos materiais obturadores, não conseguiu erradicar os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (SCR), por vezes, resistentes às substâncias químicas utilizadas durante o preparo químico-mecânico, ou, devido a complexa morfologia dos condutos radiculares como istmos, foraminas, ramificações, reentrâncias, canais laterais, acessórios e deltas apicais^{1,2,3}. Essa morfologia pode dificultar a limpeza correta dos túbulos dentinários possibilitando a permanência do biofilme bacteriano, e do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), levando o tratamento endodôntico ao fracasso^{4,5}.

Com o principal objetivo de combater os possíveis microrganismos que resistiram a etapa de preparo do canal, torna-se imperioso a colocação da medicação intracanal no SCR¹. Para isso, essas medicações devem apresentar-se biocompatíveis com os tecidos perirradiculares uma vez que permanecem em contato direto com o ligamento periodontal, cimento e, por vezes, com o tecido ósseo, como nos casos de extravasamentos acidentais ou intencionais.

Como forma de conhecer os possíveis efeitos tóxicos das medicações intracanaís, estudos em animais e testes de citotoxicidade com diversas células do periodonto têm sido realizados pela comunidade científica⁶⁻¹⁰.

Apesar das pesquisas demonstrarem que algumas medicações intracanaís apresentam citotoxicidade aos tecidos, dados científicos relacionados a esse assunto ainda podem ser considerados escassos na literatura^{3,11}. Diante disso, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito citotóxico de medicações intracanaís, sobre a viabilidade dos fibroblastos em diferentes períodos observacionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOCOMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade é a capacidade que um material possui em causar o mínimo de reação alérgica, inflamatória e tóxica quando em contato com os tecidos, de modo a não promover destruição tecidual e nem interferir no processo de cura¹².

Dos medicamentos utilizados na prática endodôntica, têm-se exigido que possuam a propriedade da biocompatibilidade, não sendo carcinogênico e nem genotóxico as células, pois são colocados no interior dos canais radiculares, próximos aos tecidos periapicais e, por vezes, em íntimo contato com eles, como nos casos de extravasamentos via forame apical, reabsorções radiculares e perfurações radiculares¹³⁻¹⁶.

Os produtos da degradação desses materiais também podem entrar em contato, com as células existentes nos tecidos perirradiculares, resultando em inflamação, com uma enorme variedade de mediadores químicos inflamatórios, incluindo, a histamina, as cininas, e neuropeptídeos, que em altos níveis causam destruição tissular e retardam o processo cicatricial¹⁰. Por isso, esses medicamentos devem possuir a capacidade de induzir o reparo na região lesada sem interferir na osteogênese e cementogênese^{7,17}.

2.2 MEDICAÇÕES INTRACANAIS

As medicações intracanaís são substâncias inseridas nos condutos radiculares entre as sessões do tratamento endodôntico e apresentam alguns objetivos tais como: eliminar os microrganismos que sobreviveram ao preparo biomecânico, neutralizar endotoxinas, impedir a entrada de microrganismos provenientes da saliva, diminuir a sintomatologia dolorosa e o

processo inflamatório perirradicular, solubilizar matéria orgânica, controlar a reabsorção dentária inflamatória externa e estimular a reparação por tecido mineralizado^{13,18-25}.

Na prática endodôntica, alguns medicamentos intracanaís podem ser utilizados como o hidróxido de cálcio P.A, o iodofórmio e o Otosporin®^{2,11,21}.

2.2.1 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO P.A

O hidróxido de cálcio se apresenta na forma de um pó branco, com partículas de tamanho e formato que possibilitam a penetração direta nas aberturas dos túbulos dentinários²⁶. Essa substância apresenta uma série de indicações justificando o seu uso de forma abrangente na prática endodôntica como em casos que necessitam de capeamento pulpar direto, em pulpectomias, necropulpectomias sem e com lesão periapical, trauma dental rizogênese incompleta, reabsorções radiculares e em revascularização^{13,24,27-30}.

A principal característica do hidróxido de cálcio é possuir pH alcalino, com valor de 12,8³¹, proporcionado pela alta disponibilidade dos íons hidroxila (OH⁻) após a dissociação do hidróxido de cálcio em íons Ca²⁺ e OH⁻, quando em meio aquoso³². O pH alcalino é o responsável pela propriedade antimicrobiana observada neste medicamento^{33,34} sendo que os íons Ca²⁺ apresentam o papel de auxiliar na formação de tecido mineralizado^{14,35}. Essa substância ainda expressa a capacidade de dissolver tecido orgânico e de neutralizar a endotoxina bacteriana^{21,22,25,36}.

O hidróxido de cálcio quando em contato direto com os tecidos subcutâneos induz reação inflamatória de intensidade moderada a severa sendo observada desnaturação proteica das células, neutrofilia, área de necrose e calcificações distróficas. Com o passar do tempo o hidróxido de cálcio induz proliferação angioblástica moderada, tecido fibroso com cápsula e quantidade moderada de fibras colágenas³⁷⁻³⁹. Mesmo apresentando essas reações teciduais, alguns estudos consideram o hidróxido de cálcio biocompatível e não genotóxico⁴⁰⁻⁴² uma vez que a reação tecidual não causa danos irreparáveis aos tecidos. A biocompatibilidade dessa substância está relacionada com a sua pouca solubilidade, posto que a liberação e dissolução dos seus componentes para o meio ocorrem lentamente³¹.

2.2.2 IODOFÓRMIO

O iodofórmio apresenta-se comercialmente na forma de cristais, com coloração amarelo - brilhante, radiopaco e pouco solúvel em água^{43,44}. É composto por alto teor de iodo que proporciona a este medicamento grande poder antimicrobiano,⁴⁵ sendo bastante utilizado em tratamento endodôntico de dentes decíduos com necrose pulpar, obtendo altos índices de sucesso⁴⁶.

O iodofórmio apresenta biocompatibilidade com os tecidos promovendo menor duração da reação inflamatória quando comparado as outras medicações intracanaís, apresentando uma pequena área de necrose restrita à região da ferida e circundada por infiltrado inflamatório de intensidade discreta, com predomínio de macrófagos⁴⁷. No entanto, Moskovitz et al.⁴⁸ (2012) observaram que o iodofórmio pode causar irritação nos tecidos ao redor do ápice radicular, sendo capaz de causar reabsorção radicular externa.

Entretanto, o iodofórmio após o contato com células de osteossarcoma humano, não promoveu destruição do DNA, apresentando-se como não genotóxico aos tecidos⁴⁹.

2.2.3 OTOSPORIN®

O Otosporin® é uma associação do corticosteróide hidrocortisona, associada aos antibióticos sulfato de polimixina B e sulfato de neomicina, destinado inicialmente as infecções no ouvido, como por exemplo, a otite externa. Entretanto, passou a ser utilizado na Endodontia pelas suas excelentes propriedades anti-inflamatória, imunossupressora e vasoconstritora, modulando dessa forma, a intensidade da reação inflamatória provocada pelo ato cirúrgico da pulpectomia e, conseqüentemente, eliminando a dor pós-operatória⁵⁰. Apresenta-se, comercialmente, em suspensão aquosa, com pH ácido (5,4)⁵¹, na cor branca, sendo de fácil manipulação, inserção e remoção dos condutos radiculares⁵².

Os antibióticos que compõem o Otosporin® apresentam ação sobre microrganismos gram-negativos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e alguns gram-

positivos como os estafilococos⁵³. Entretanto, para neutralizar a endotoxina bacteriana, este medicamento não demonstrou efetividade⁵⁴.

Com relação à parte biológica, foi observado que o Otosporin®, como medicação intracanal, induziu uma resposta inflamatória severa aos tecidos com intenso infiltrado neutrofílico e abscessos, após 7 dias da realização da pulpectomia em dentes de cães e em subcutâneo de ratos. Esse resultado deve-se a inativação desta medicação após 72h e a limitação da atividade anti-inflamatória do Otosporin® à fase aguda da inflamação, sendo pequena a influência em estágios mais avançados da resposta inflamatória^{39,55}.

2.2.4 VEÍCULOS

Os veículos são substâncias adicionadas ao soluto para a formação do curativo de demora, cujo o objetivo é facilitar o processo de manipulação e inserção da medicação intracanal no canal radicular, bem como, também de permitir maior dissociação e difusão dos seus componentes químicos para o meio⁵³.

Os veículos podem ser: aquosos, tais como água destilada, soro fisiológico e solução anestésica; viscosos como glicerina, propileno glicol e polietileno glicol; e os oleosos, como óleo de oliva e cânfora. A escolha desses veículos vai depender do processo patológico pulpar instalado e da disponibilidade de tempo do paciente, uma vez que ocorre variação na velocidade de dissociação dos componentes químicos da medicação intracanal com quem os veículos se associam. Os aquosos proporcionam maior liberação do princípio ativo da medicação intracanal, enquanto que os viscosos e os oleosos apresentam liberação de íons moderada e lenta, respectivamente³².

A cânfora passou a ser associada ao paramonoclorofenol com a finalidade de diminuir seu poder irritante⁵⁶ e, dessa maneira, poder ser utilizado como veículo ativo nas medicações intracanaís. Sua citotoxicidade também é reduzida quando associado ao hidróxido de cálcio na pasta hidróxido de cálcio-paramonoclorofenol canforado-glicerina (HPG)⁵⁷⁻⁵⁹. Apesar de ser um veículo viscoso, algumas pesquisas demonstraram que o paramonoclorofenol canforado

(PMCC) permitiu alta disponibilidade de íons da medicação intracanal associada a ele para o meio^{32,60}.

Essa substância apesar de apresentar propriedade antimicrobiana contra o *E. faecalis* e *Streptococcus mutans*^{1,61} e de induzir irritação aos tecidos, não possui efeito genotóxico e nem mutagênico às células teciduais⁴⁹.

2.3 CULTURA DE CÉLULAS

O método de utilizar células em experimentos laboratoriais foi desenvolvido como forma de estudar as células animais fora do organismo, em um ambiente controlado, utilizando um meio de cultura com composição padrão, ambiente de incubação definido, condições de trabalho estéreis, além de apresentar homogeneidade na amostra quando comparada ao uso de animais em experimentos⁶.

A técnica de cultura celular, por ser um experimento *in vitro*, apresenta algumas diferenças quando comparada com o modelo *in vivo*, como, por exemplo, a proliferação celular que ocorre de forma tridimensional quando nos tecidos, enquanto que no laboratório apresenta um meio que favorece o espalhamento e migração da célula. Apesar disso, o cultivo celular tornou-se o principal modelo para substituição de animais em experimentos como forma de protegê-los e diminuir sua aplicabilidade, sendo incentivado pelos comitês de ética de pesquisa em animal⁶².

Dessa forma, a cultura celular também passou a ser utilizada em pesquisas na área da Odontologia com a finalidade de analisar o processo de cura dos tecidos e os diferentes mecanismos que causam a morte e/ou dano celular provocados por materiais odontológicos⁶³.

Em uma cultura celular, as células podem ser primárias - quando são oriundas de um fragmento de tecido e obtidas por desagregação mecânica ou enzimática sendo mantidas suas características genotípicas e fenotípicas por um curto tempo de vida; contínuas ou permanentes - são células mais estáveis que sobreviveram ao processo de repicagem apresentando alta capacidade de proliferação e ainda guardam características do tecido de origem; e, células

transformadas – quando as características das células são modificadas deixando de ser semelhante ao tecido original⁶⁴.

Diversos tipos celulares tem sido utilizados para a análise de citotoxicidade como fibroblastos de humanos e de murinos, macrófagos de humanos e de murinos, células-tronco, odontoblastos, osteoblastos, leucócitos e monócitos^{9,11,65-70}. Essas células são escolhidas a depender das características biológicas dos materiais que serão testados e do objetivo do estudo⁶³.

Os fibroblastos são um típico modelo de células utilizados em ensaios de citotoxicidade devido ao seu rápido e fácil crescimento⁹. São os maiores constituintes do tecido conjuntivo, sendo o tipo de célula mais predominante no ligamento periodontal e os maiores produtores de colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas - componentes da matriz extracelular⁷. Dessa maneira, participam de forma intensa da reparação tecidual, migrando para a ferida após serem ativados pelos fatores quimiotáticos secretados pelos macrófagos como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Multiplicam-se, secretam citocinas (interleucinas e TNF- α) e fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II), produzem colágeno tipo III, proteoglicans, fibras elásticas e colágeno tipo I¹².

Para as pesquisas de citotoxicidade, podem ser utilizadas as células de humanos e de murinos uma vez que apresentam comportamento similar e, por isso, são apropriadas para os modelos *in vitro* de testes de viabilidade e proliferação de produtos endodônticos⁷¹.

2.4 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade apresentam algumas vantagens tais como simplicidade, rapidez, economia e a capacidade de testar um grande número de materiais sob as mesmas condições quando comparados com outros métodos⁶.

A análise da citotoxicidade pode ser observada através da viabilidade e proliferação das células em métodos de ensaio, como o colorimétrico, que utilizam reagentes e corantes para

destacar as células facilitando sua contagem, sendo que alguns corantes penetram nas células mortas e outros, reagem com as células vivas. Diversos reagentes e corantes tem sido citados na literatura tais como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), 2-(2-methoxi-4-nitrofenil)-2H-tetrazolio (WST), sódio 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio sal interno (XTT), azul de Trypan, cristal violeta, laranja de acrodinia e vermelho neutro^{8,11,17,65,72-75}.

O ensaio colorimétrico com o reagente MTT vem sendo utilizado frequentemente para avaliar a citotoxicidade inespecífica de diversos tipos de materiais odontológicos dentre eles também os endodônticos, por ser um teste padronizado pela *International Organization of Standardization* (ISO) 10993-5⁷⁶ (2009), simples, versátil, rápido, confiável, reproduzível e que não utilizam radioisótopos^{8,9,77,78}.

Mosmann⁷⁹ (1983) descreveu, com detalhes, esse método que está baseado na mensuração da atividade mitocondrial através da clivagem do anel do sal tetrazólio pela enzima succinildesidrogenase existente nas células. Durante essa quebra ocorre a conversão da solução amarela do MTT em cristais de formazan azuis escuro. Dessa forma, somente células vivas realizam essa redução enquanto células mortas ou com algum tipo de dano, não conseguem reagir com a solução.

2.5 PESQUISAS SOBRE CITOTOXICIDADE DE MEDICAÇÕES INTRACANAIS

A literatura é vasta quando se trata de pesquisas científicas sobre citotoxicidade de materiais endodônticos entretanto, é escassa quando o assunto é citotoxicidade de medicações intracanaís. Nesse ínterim, estão os estudos citados abaixo como os de:

Chang et al.⁸⁰ (1998) analisaram a citotoxicidade e genotoxicidade do fenol canforado e o PMCC em cultura de células fibroblásticas pulpare humanas utilizando o ensaio de fluorescência com o corante iodeto de propídio, para a análise da viabilidade celular e, o ensaio de precipitação de DNA, para a análise genotóxica. Os autores utilizaram na pesquisa concentrações que variaram de 0,01 a 10 mM e, após 24h, foi observado que os dois materiais

foram citotóxicos aos fibroblastos, sendo que o PMCC foi mais citotóxico que o fenol canforado e que nenhum dos dois apresentaram genotoxicidade.

Guigand et al.⁸¹ (1999) avaliaram a compatibilidade de três materiais endodônticos: hidróxido de cálcio, óxido de cálcio e cimento a base de óxido de zinco e eugenol quando em contato com fibroblastos de murino NIH3T3, através de três técnicas complementares: método colorimétrico MTT, microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo. A leitura foi realizada através do espectrofotômetro com densidade óptica de 570nm, nos períodos experimentais de 24h, 72h e 7 dias. Os autores observaram que o cimento de óxido de zinco e eugenol foi o mais citotóxico dos três e, que o óxido de cálcio e o hidróxido de cálcio obtiveram comportamentos semelhantes. No período de 24h, o hidróxido de cálcio apresentou 97% de células viáveis, em 72h esse valor diminuiu para 83% e em 7 dias observou-se proliferação celular comparável ao grupo controle.

Al-Shaher et al.⁸² (2004) analisaram a toxicidade do hidróxido de cálcio e do própolis em células da polpa e do ligamento periodontal após serem isoladas de terceiros molares extraídos. Foram realizadas diluições de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 2,4mg/ml dos materiais e colocados em contato com as células por 20h. Após esse período, a análise foi realizada com o corante cristal violeta utilizando espectrofotômetro num comprimento de onda de 550nm. Os autores observaram que o hidróxido de cálcio, mesmo em concentrações pequenas como 0,4mg/ml matou mais de 75% das células do ligamento periodontal e mais de 90% das células da polpa e concluíram que o hidróxido de cálcio apresentou maior citotoxicidade do que o própolis.

Barnhart et al.⁸³ (2005) mensuraram a citotoxicidade do hipoclorito de sódio, do iodeto de potássio, dióxido de cloro, dicloridrato de betaistina (Betadine) e solução de hidróxido de cálcio quando em contato com fibroblastos gengivais humanos por 15 minutos utilizando kit de ensaio CyQuant. Os autores fizeram algumas diluições tais como 0,01%, 0,1%, 1%, 10% e observaram que o dicloridrato de betaistina foi o mais citotóxico de todos os materiais testados e a solução de hidróxido de cálcio foi a que apresentou o maior número de células vivas, juntamente, com o iodeto de potássio.

Silva et al.⁸⁴ (2008) avaliaram a citotoxicidade e a atividade da fosfatase alcalina da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e da associação dessa pasta com a clorexidina a 0,4% na concentração de 25µg/mL quando em contato com os osteoblastos durante 3, 7 e 10 dias. Para análise da citotoxicidade foi utilizado o reagente MTT num comprimento de onda de 570nm.

Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre as pastas testadas nem com relação a viabilidade e nem na atividade da fosfatase alcalina. Em 7 dias houve um aumento na viabilidade celular de todas as pastas que foi semelhante com 10 dias.

Barbosa et al.⁸⁵ (2009) analisaram a citotoxicidade de uma solução saturada de hidróxido de cálcio, lauril sulfato de sódio e a associação desses dois (HCT20) em quatro concentrações (5%, 10%, 20% e 50%) sobre células fibroblásticas L929 utilizando o método do cromo radioativo. Após os períodos experimentais de 4 e 24h, foi observado que todas as soluções demonstraram algum nível de toxicidade sendo que, na concentração de 50%, a solução de hidróxido de cálcio foi mais citotóxica, enquanto que nas demais seu comportamento foi similar ao grupo controle.

Correa et al.⁶⁷ (2009) avaliaram a citotoxicidade do AH Plus, Fill Canal e de uma pasta a base de hidróxido de cálcio em monócitos THP-1. Foram realizadas várias diluições a partir do extrato original (100%) em 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% com o próprio meio de cultura utilizado na metodologia, RPMI 1640. Após 24h em contato com as células, foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de Trypan 0,2% e, observou-se que o extrato original e a diluição de 10% de todos os produtos testados, diminuiram significativamente a viabilidade celular, e que diluições abaixo de 1% causaram mínima morte celular quando comparadas com o controle. Entre os materiais testados, a pasta a base de hidróxido de cálcio foi a que apresentou a menor citotoxicidade quando em contato com os monócitos.

Sepet et al.⁸⁶ (2009) avaliaram a viabilidade, citomorfologia e a proliferação dos fibroblastos 3T3, quando em contato com as pastas de hidróxido de cálcio e agregado de trióxido mineral (MTA) no períodos experimentais de 24h, 48h e 7 dias, utilizando o corante azul de Trypan 0,4% para a análise da viabilidade e o 5-bromo-29-deoxyuridine (BrdU) para a análise da proliferação celular através da imunohistoquímica. Foi observado que a morfologia das células não foi alterada com o passar dos períodos de incubação com nenhum dos materiais analisados e, que o número de células viáveis em contato com o hidróxido de cálcio foi diminuindo de acordo com os tempos experimentais, porém sem redução significativa. Não houve proliferação celular quando em contato com nenhum dos dois materiais, apresentando apenas efeito citostático no período de 24h para o MTA e, 48h para o hidróxido de cálcio.

Yasuda et al.³ (2010) investigaram o efeito da pasta de hidróxido de cálcio, do peróxido de hidrogênio 3%, do hipoclorito de sódio a 5,25%, do etileno de amino tetra acético (EDTA) a 17%, da clorexidina a 0,12% e da associação entre doxiciclina-ácido cítrico-Tween 80 (BioPure MTAD) na viabilidade, na atividade da fosfatase alcalina e na expressão do gene da sialoproteína óssea, utilizando células osteoblásticas MC3T3-E1 e do ligamento periodontal. Após 24h de exposição das células às várias concentrações (500-10.000µg/mL) dos materiais analisados, foi realizado o ensaio com MTT, apresentando baixa porcentagem de células viáveis, quando em contato com a pasta de hidróxido de cálcio em praticamente, todas as concentrações analisadas. No que se refere a atividade da fosfatase alcalina e a expressão do gene da sialoproteína óssea, não foi observado diminuição significativa na atividade, indicando que pasta de hidróxido de cálcio não interfere na diferenciação e nem no processo de mineralização das células.

Miura et al.⁸⁷ (2010) analisaram a toxicidade do hidróxido de cálcio, PMCC, Otosporin®, formocresol em células-tronco. Foram utilizadas diluições 1:9, 1:27 e 1:81 das medicações e deixadas em contato por 2 horas com as células. Após esse período, a viabilidade celular foi analisada utilizando o ensaio colorimétrico MTT e foi observado que o PMCC e o formocresol apresentaram alta toxicidade próximo a 100% em todas as diluições, o Otosporin® apresentou baixa citotoxicidade nas maiores diluições e alta citotoxicidade na menor diluição, enquanto o hidróxido de cálcio demonstrou ser o menos citotóxico em todas as diluições.

Ruparel et al.⁷⁰ (2012) avaliaram a sobrevivência de células-tronco humana da papila apical quando em contato com a pasta antibiótica tripla (metronidazol, ciprofloxacino e minociclina), pasta antibiótica dupla (metronidazol e ciprofloxacino), pasta antibiótica tripla modificada (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor), amoxicilina com ácido clavulânico (Augmentin) e pasta de hidróxido de cálcio (Ultracal- Ultradent, South Jordan, UT), nas concentrações de 100mg/mL até 0,001mg/mL por 3 dias. Para isso, os autores utilizaram o ensaio com o corante azul de Trypan e concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio, em todas as concentrações, promoveu sobrevivência celular, enquanto que nas demais pastas, isso só ocorreu nas maiores diluições, a partir da concentração 1mg/mL.

Silva et al.⁷⁴ (2012) investigaram a citotoxicidade e a atividade gelatinolítica das enzimas matriz metaloproteínase 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) produzidas pelos fibroblastos 3T3 após a estimulação com cimento de aluminato de cálcio (EndoBinder- Binderware, São Carlos,

SP, Brasil), MTA, hidróxido de cálcio P.A por 24h. Para a citotoxicidade, foi utilizado o ensaio MTT, sendo lido em espectrofotômetro com a densidade óptica de 570nm, e para a mensuração da atividade gelatinolítica, foi realizado o ensaio de zimografia. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio P.A. apresentou menor viabilidade celular e maior expressão da atividade gelatinolítica da MMP-2 quando comparado aos demais materiais testados. Nenhum deles induziram a atividade gelatinolítica da MMP-9.

O estudo de Petel et al.¹¹ (2013) avaliou a viabilidade dos macrófagos RAW 264,7 e das células epiteliais RKO quando em contato, direto e indireto, com um material indicado para tratamento de pulpectomia de dentes decíduos a base de hidróxido de cálcio-iodofórmio-silicone (Endoflas F.S- Sanlor&Cia, Colombia). Foram produzidos extratos dessa medicação em várias concentrações (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024) e colocados em contato com as células por 24h. A viabilidade celular foi testada com o método colorimétrico XTT e foi observado que em altas concentrações o material reduziu a viabilidade celular dos macrófagos em 80%, enquanto que para as células epiteliais essa redução foi de 60% possuindo, dessa forma, efeito citotóxico. Em baixas concentrações, o efeito foi proliferativo.

Yadlapati et al.⁷⁸ (2013) analisaram a citotoxicidade da pasta antibiótica tripla (metonidazol, ciprofloxacino, minociclina), da pasta antibiótica dupla (metronidazol e ciprofloxacino), minociclina e hidróxido de cálcio em pó quando em contato com fibroblastos do ligamento periodontal humano. Outro objetivo do estudo foi avaliar a habilidade desses medicamentos em induzir citocinas como interleucina-1 α , interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-8, interleucina-10, interleucina-16 e TNF- α dos fibroblastos. Para tal finalidade foi realizado o ensaio de citotoxicidade multiparamétrico que consiste na análise de três parâmetros: a respiração mitocondrial com o reagente XTT, a integridade da membrana com o corante vermelho neutro e a densidade de células através da coloração do DNA com o corante violeta de cristal. Para a análise das citocinas foi realizado o *polymerase chain reaction* (PCR). Após 24h e 48h em contato com os materiais, os autores observaram que o hidróxido de cálcio apresentou viabilidade maior que 70%, enquanto a pasta antibiótica tripla foi a que possuiu menor valores de viabilidade celular. Com relação a indução da expressão de interleucinas, somente na pasta antibiótica tripla foi observado maiores níveis da interleucina-6.

Neiva et al.⁸⁸ (2013) analisaram a toxicidade da polimixina B em células renais com dosagens de 75mM e 375mM e tempos de contato de 24h, 48h, 72h. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão dos corantes fluorescentes laranja de acrodina e brometo de etídio sendo observado em 24h apenas 57% de células viáveis com a dosagem de 75mM e que com 375mM essa viabilidade foi de apenas 41%. Com 72h de contato com a polimixina B, 56% das células permaneciam viáveis na dosagem mais baixa e 40% na maior dosagem. Esses resultados sugerem que a polimixina B é dose e tempo dependente.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

- Analisar o grau de citotoxicidade de medicações intracaneais sobre as células fibroblásticas de murino L929.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar a viabilidade celular de medicações intracaneais a base de hidróxido de cálcio, iodofórmio, Otosporin® e suas associações, nos períodos experimentais de observação.
- Avaliar o tempo em relação a viabilidade celular de cada medicação intracanal.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 TIPO DE ESTUDO

Essa pesquisa foi desenvolvida sob o modelo de um estudo analítico, experimental, não randomizado e quantitativo.

4.1.2 VARIÁVEIS

Esse estudo apresenta duas variáveis independentes: medicação intracanal e tempo experimental. A variável dependente é o valor da absorbância, medida em unidades de absorbância.

4.1.3 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Patologia do Hospital Universitário Professor João Cardoso Nascimento Junior, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Linhagem de células permanentes fibroblásticas de murino L929 - banco de células do Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Patologia do Hospital Universitário Professor João Cardoso Nascimento Junior, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).
- Câmara de fluxo laminar (ClassII Biohazard Cabenet Model 36208, Labconcorporation, Kansas City, Missouri, EUA)
- Criotubos (Global Trade Technology, São Paulo, Brasil)
- Tubo tipo Falcon de 15mL e 50mL (Guangzhou Jet Bio-Filtration Products Co., Ltda., Guangdong, China)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Centrífuga (Hermll Labortechnik GmbH –Siemensstrasse 25D-78564, Wehingen, Germany)
- Frasco de cultivo de 25cm², 75cm² e 150cm² (Greiner Bio-one, Americana, São Paulo, Brasil)
- RPMI 1640 com L-glutamina (Gibco, Life Technologies Co., Carlsbad, Calif., USA)
- Soro bovino fetal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Estufa (Estufa CO₂ Incubator, Sanyo Scientific electric Co. Ltda., MCO-17AC, Japão)
- Microscópio de fase invertido (Nikon eclipse TS100-F Listed, Japan)
- Tripsina a 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, SP, Brasil)
- Ácido etilenodiaminotetraacético a 0,05% (Gibco, Life Technologies Co., Carlsbad, Calif., USA)
- Câmara de Newbauer espelhada 0,0025mm² (Precicolor HGB, Germany)
- Placa de 96 poços com fundo chato e placa de 24 poços (Prolab, São Paulo-SP, Brasil)
- Hidróxido de cálcio (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil)
- Iodofórmio (K-dent, Quimidrol, SC, Brasil)

- Otosporin® (Farmoquímica S/A, RJ, Brasil)
- Água destilada (Eurofarma Laboratórios LTDA, SP, Brasil)
- Paramonoclofenol canforado (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil)
- Glicerina (Farmácia Única, Aracaju, SE, Brasil)
- Placa de vidro
- Espátula 24F (SSWhite duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Peagâmetro digital (Ion pH500, Ionlab, Curitiba, PR, Brasil)
- Pipetas digitais (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA)
- Metiltetrazólio (Sigma, St. Louis, MO, EUA)
- Isopropanol acidificado com HCL a 0,04M/l
- Agitador de Microplacas (Agitador magnético Agimax- Kasvi, Curitiba, Paraná)
- Espectrofotômetro de microplacas (Microplate Spectrophotometer- Epoch™, Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

4.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Toda a metodologia da pesquisa foi realizada de acordo com as normas da *International Organization of Standardization (ISO) 10993-5: 2009*⁷⁶, organização que padroniza os testes de citotoxicidade.

4.3.1 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Os procedimentos realizados nessa pesquisa que necessitavam de ambiente estéril foram executados dentro da câmara de fluxo laminar. Para o descongelamento das células fibroblásticas, os criotubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 1 minuto com 5mL de solução salina estéril com a finalidade de diluir o DMSO, substância utilizada para congelar as células que em temperatura ambiente é tóxica para elas. Todo esse conteúdo foi vertido para um tubo estéril tipo Falcon de 15mL e centrifugado a uma temperatura de 4°C, em 1750 rpm

por 10 minutos com o objetivo de separar as células do líquido sobrenadante. Essas foram aspiradas e ressuspensas em 2mL de meio de cultura completo - RPMI 1640 com L-glutamina suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina (10000UI/mL). Em seguida, todo o conteúdo do tubo Falcon foi transferido para o frasco de cultivo de células de 25cm² (50mL) e, com o objetivo de completá-lo, foi adicionado mais 3mL de meio de cultura completo. As células foram levadas a incubadora em atmosfera úmida a 37°C, com 5% CO₂ e 95% de ar, de acordo com Cornélio et al.⁶⁶ (2011).

4.3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS

Os fibroblastos foram cultivados e mantidos em estufa de CO₂, e a cada dois dias o meio de cultura foi renovado para que as células não morressem por falta de nutrientes. O monitoramento diário do crescimento das células foi realizado utilizando-se microscópio de fase invertido onde se observou a morfologia e o comportamento dos fibroblastos (aderência e proliferação). Após a confirmação no microscópio de 80% de confluência (porcentagem de células que proliferaram na base do frasco de cultura), foi iniciado o subcultivo das células através de passagens consecutivas de frascos de cultura. Em cada passagem as células aderidas foram desprendidas da garrafa de cultura por meio de digestão enzimática utilizando 5mL de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiaminotetraacético a 0,05% sendo que, todo o conjunto foi levado a incubadora a 37°C por 5 minutos⁸⁹.

Em microscópio invertido de fase, observou-se o desprendimento das células e, então, inativou-se a tripsina com a adição de 5mL de RPMI 1640 acrescido com 10% de SBF. As células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 1250rpm, numa temperatura de 5°C por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e os precipitados de células (*pellets*) resultantes da centrifugação foram ressuspensos em 2mL de meio de cultura completo e depositados em novo frasco de cultura com maior área para que as células pudessem se multiplicar. Dessa forma, foram realizadas três passagens no total até que se atingisse o número de células suficientes para o plaqueamento.

4.3.3 PLAQUEAMENTO

Nesta fase do experimento, as células foram tripsinizadas e contadas na câmara de Newbauer para a determinação do número de células existentes no frasco, a fim de proceder-se a diluição necessária para o plaqueamento em placas de cultura de 96 poços com fundo chato. A diluição das células foi realizada com RPMI 1640 completo de forma que 100µl dessa suspensão celular preparada fossem semeadas nos poços contendo 1×10^5 células/poço. Em seguida, as placas de 96 poços foram acondicionadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 24h para que os fibroblastos pudessem aderir no fundo dos poços⁸⁹⁻⁹¹.

4.3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As medicações intracanáis utilizadas para a análise de citotoxicidade nesta pesquisa foram hidróxido de cálcio, iodofórmio e Otosporin® e os veículos selecionados para o preparo das associações foram a água destilada, a glicerina e o paramonoclorofenol canforado, por serem as medicações intracanáis e associações mais utilizadas na clínica endodôntica. Para facilitar a análise, foram divididas em grupos, como descrito no quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos grupos e das dosagens das medicações intracanáis.

Grupos	Componentes	Dosagem
HPG	Hidróxido de cálcio P.A.	1g
	Paramonoclorofenol canforado	100µL
	Glicerina	1.2mL
IG	Iodofórmio	1.5g
	Glicerina	600µL
HC	Hidróxido de cálcio P.A.	1g
	Água destilada	1.1mL
HCI	Hidróxido de cálcio P.A.	1.5g
	Iodofórmio	1.5g
	Água destilada	1.75mL
IA	Iodofórmio	1.5g
	Água destilada	600µL
OT	Otosporin®	40µL
Controle	Meio de cultura	100µL
	Fibroblastos	

4.3.5 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA E DOS ELUATOS

Nessa pesquisa, para a sensibilização das células fibroblásticas, foi selecionado o teste de contato indireto, no qual eluatos das medicações intracanáis testadas foram produzidos a partir da difusão dos componentes de cada medicação intracanal para o meio de cultura e colocados em contato com as células fibroblásticas. Não foi realizada nenhuma diluição a partir dos eluatos originais com a finalidade de simular a rotina da prática clínica endodôntica, em que diluições não são realizadas^{74,86}.

Para tanto, as medicações em pó foram manipuladas dentro da câmara de fluxo laminar, sobre placa de vidro estéril com o auxílio da espátula 24F, de acordo com a dosagem acima descrita, até que fosse obtida a consistência de uma pasta (Figura 1 e 2). Em seguida, os corpos de prova foram confeccionados, de modo que a forma e o volume fossem padronizados para todos os grupos. Para isso, as pastas, foram inseridas em tubos de polietileno estéreis com o diâmetro de 5mm por 2mm de profundidade, enquanto que, o Otosporin® foi armazenado em tubos de 2mL do tipo *ependorfs* estéreis⁹².



Figura 1. Manipulação da pasta de hidróxido de cálcio-água destilada.

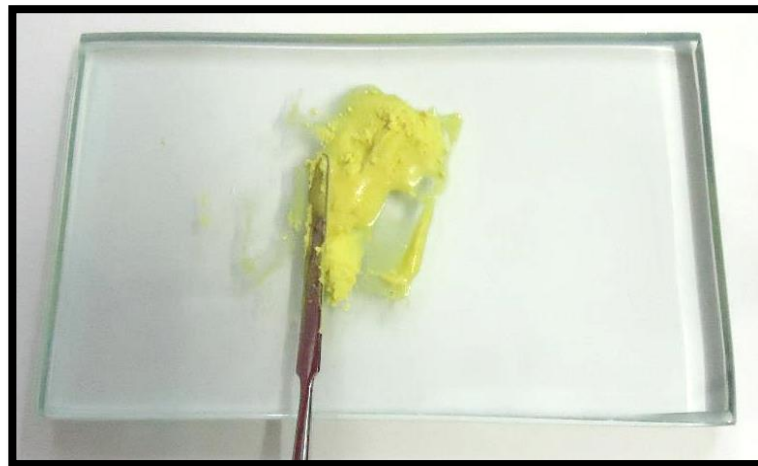


Figura 2. Manipulação da pasta de iodofórmio-glicerina.

Todas as medicações foram acondicionadas em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ durante 24h para que os corpos de provas iniciassem a presa e, facilitassem o processo de remoção dos tubos de polietileno⁹³. Após esse período, as medicações, ainda dentro dos tubos de polietileno e dos *eppendorfs*, foram esterilizadas por meio de radiação ultravioleta por 1h para evitar qualquer tipo de contaminação⁶⁸. Para a remoção das medicações do interior dos tubos de polietileno, foi realizada pressão no êmbolo existente no interior dos próprios tubos. Somente no caso do Otosporin®, utilizou-se 40µL da substância como corpo de prova, sendo que essa medida foi obtida a partir do volume do tubo de polietileno, $V = \pi r^2 h$.

Para cada grupo, foram confeccionados três corpos de prova, posicionados no fundo da placa de cultura de 24 poços. Em seguida, 2mL de meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e sem soro bovino fetal e antibiótico foram inseridos nos poços e, todo o conjunto foi armazenado em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 24h, para que os produtos ativos das medicações intracanalís pudessem se difundir pelo meio de cultura produzindo os eluatos de cada medicação intracanalís^{8,17} (Figura 3). De cada medicação foi produzido 3 eluatos, inclusive do grupo controle.

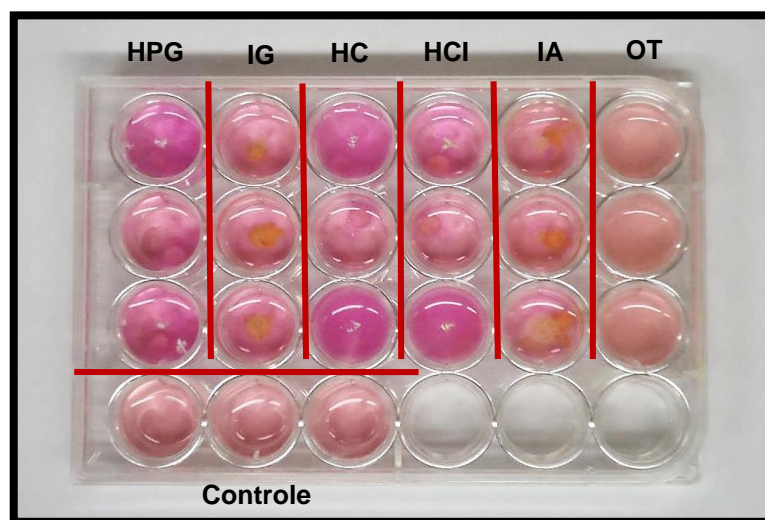


Figura 3. Preparação dos eluatos das medicações intracanalís na placa de cultura de 24 poços.

4.3.6 CONTATO DAS CÉLULAS COM OS ELUATOS

Na placa de cultura de 96 poços onde estavam os fibroblastos aderidos, foi removido cuidadosamente com pipeta o meio de cultura presente e, 100µL do eluato de cada medicação testada foi adicionado, em cada poço. Dessa forma, cada eluato preenchia 4 poços da placa de 96 poços onde estavam os fibroblastos, totalizando 12 poços por grupo, incluindo o grupo controle, que era composto por células e meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal¹⁰.

Toda pesquisa foi realizada em quadruplicata de cada eluato em três experimentos independentes. Em seguida, as placas de cultura foram novamente encubadas em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ pelos períodos experimentais de 24h, 48h, 72h, 5 e 7 dias^{79,83,86}.

4.3.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade das células foi determinada através do método colorimétrico utilizando o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo] com a concentração de 5mg/mL em solução salina de tampão fosfato estéril em todos os períodos experimentais. Deve-se ressaltar que, o reagente é fotossensível, assim após a sua preparação, os tubos *ependorfs* de 2mL contendo esta solução foram envolvidos em papel alumínio e a câmara de fluxo laminar permaneceu com a luz apagada durante todo o procedimento de colocação da solução nos poços.

Em cada período experimental, os eluatos foram cuidadosamente removidos dos poços e, em cada poço, foram dispensados 20µL da solução reagente de MTT e 180 µL de RPMI 1640 com L-glutamina sem soro bovino fetal e antibiótico (Figura 4). As placas de cultura foram envolvidas em papel alumínio e encubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 4h¹⁰ para que o MTT pudesse ser metabolizado. Após esse período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e desprezada, facilitando a visualização da mudança de coloração no fundo de cada poço (Figura 5). Essa reação ocorreu porque o sal metiltetrazólio da solução de MTT foi reduzido pelas enzimas desidrogenases dos fibroblastos, formando cristais de formazan, que

possuem coloração azul escuro. Esses cristais foram dissolvidos adicionando 100 μ L da solução de isopropanol acidificado com HCL a 0,04M/l em cada poço e agitando-se a placa de cultura por 30 min^{77,94} (Figura 6). A coloração da solução variou do roxo claro até o roxo escuro, de acordo com a quantidade de cristais de formazan presentes em cada poço e, conseqüentemente, de células viáveis (Figura 7). Quanto mais intensa a cor da solução, menos citotóxica a substância apresenta-se. Por fim, a leitura das placas de cultura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm^{8,9,75} (Figura 8) e os valores de absorbância de cada medicação obtidos foram proporcionais a intensidade da coloração de cada poço.

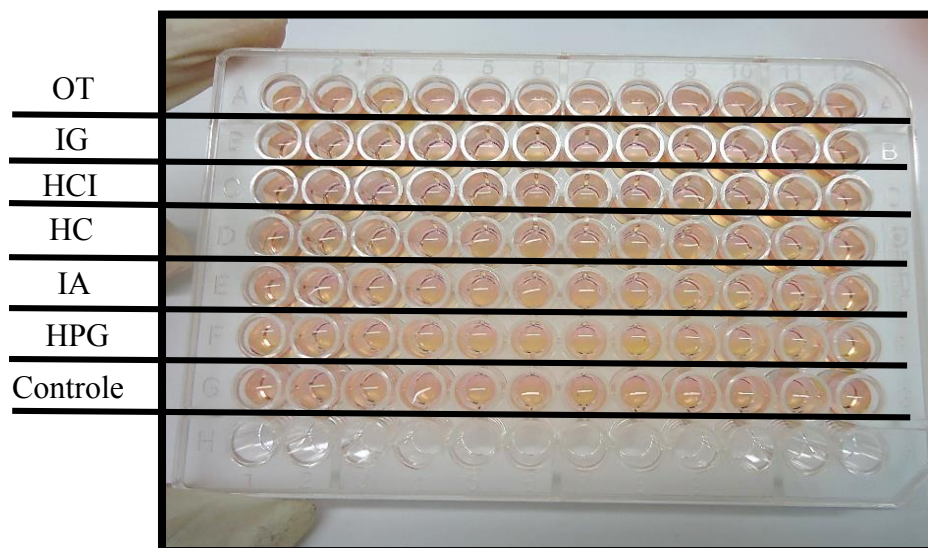


Figura 4. Placa de cultura de 96 poços contendo células fibroblásticas L929, reagente MTT e meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal.

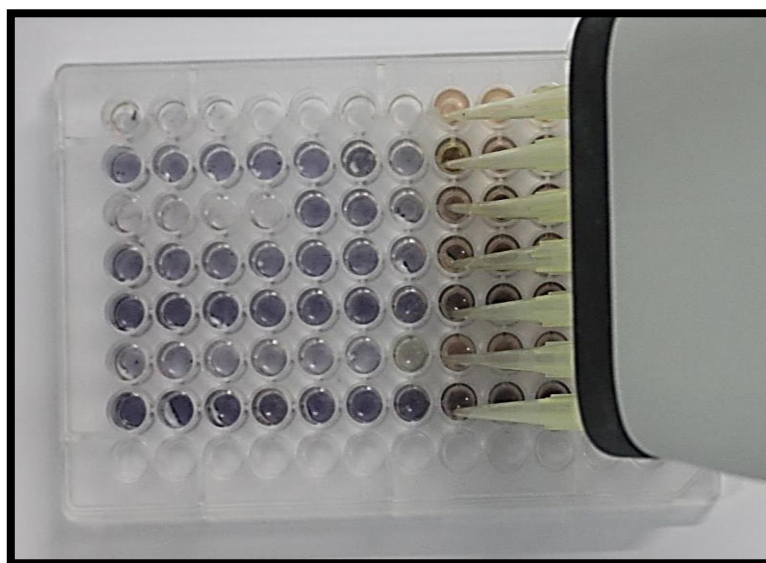


Figura 5. Remoção da solução de MTT e visualização da coloração azul no fundo dos poços.

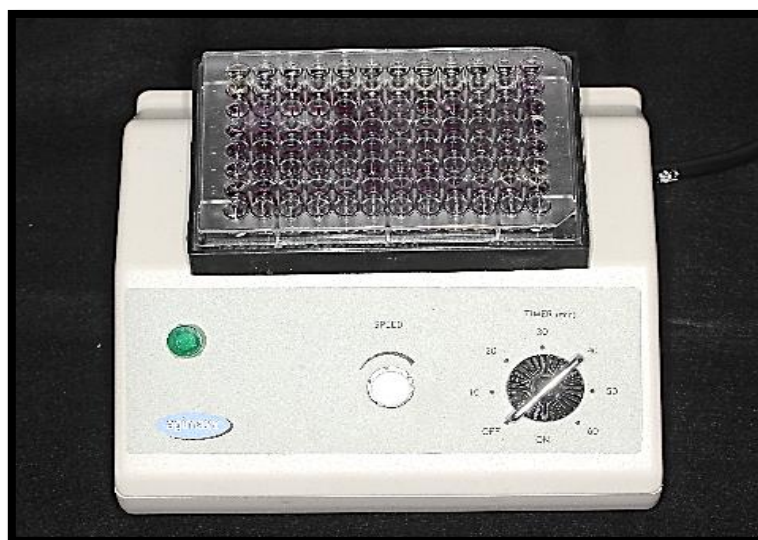


Figura 6. Aparelho agitador de microplacas com a placa de cultura de 96 poços com isopropanol acidificado com HCL 0,04M/l.



Figura 7. Placa de cultura de 96 poços com cristais de formazan dissolvidos.



Figura 8. Leitura da placa de cultura de 96 poços no espectrofotômetro.

4.4 AVALIAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da citotoxicidade foi realizada somando os valores de absorbância obtidos na leitura do espectrofotômetro, calculando a média e o desvio padrão de cada medicação intracanal testada em cada tempo experimental.

Os dados apresentaram normalidade ($P = 0,097$) e foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores, ou seja, “medicação intracanal” e “tempo de avaliação”. Diante da diferença entre os grupos, os dados foram submetidos ao pós teste de *Tukey* com nível de significância de 5%, com o intuito de saber em que grupo estava a diferença. O programa utilizado para análise estatística foi o Sigmastat 3.5.

5 RESULTADOS

A Análise de Variância mostrou efeito significativo de tratamento para os fatores “medicação intracanal” ($P < 0,001$) e “tempo de avaliação” ($P < 0,001$), e para a interação entre fatores ($P < 0,001$). As comparações múltiplas foram realizadas com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) e os resultados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Resultados de citotoxicidade em média (DP) expressa em unidades de absorbância.

Grupos	Tempo de Avaliação				
	24 horas	48 horas	72 horas	5 dias	7 dias
HPG	0,91 (0,08) Ab	1,06 (0,08) Aa	0,93 (0,11) ABb	0,56 (0,10) Bc	0,47 (0,21) Bc
IG	0,81 (0,08) Bb	1,08 (0,14) Aa	0,91 (0,10) Ab	0,67 (0,12) ABc	0,49 (0,16) Bd
HCI	0,87 (0,07) Ab	1,18 (0,16) Aa	0,82 (0,12) Ab	0,67 (0,14) ABc	0,51 (0,10) Bd
IA	0,89 (0,07) ABb	1,07 (0,10) Aa	0,93 (0,10) Ab	0,63 (0,06) Bc	0,44 (0,11) Bd
HC	0,98 (0,11) Ab	1,11 (0,11) Aa	0,79 (0,13) Bc	0,69 (0,09) Bd	0,47 (0,07) Be
OT	0,80 (0,03) Ba	0,85 (0,06) Ba	0,50 (0,16) Cb	0,25 (0,04) Cc	0,22 (0,03) Cc
Controle	1,00 (0,06) Ab	1,19 (0,14) Aa	0,95 (0,11) Ab	0,77 (0,21) Ac	0,65 (0,11) Ac

Letras distintas (maiúscula na vertical, minúscula na horizontal) indicam diferença estatística significativa ($\alpha = 0,05$).

Com os resultados obtidos, pode-se observar que em 24h os grupos HPG, HCI, HC foram semelhantes ao grupo controle, sendo os grupos IG e OT semelhantes entre si e diferentes do grupo controle, apresentando os menores valores de absorbância neste período. Em 48h, somente o grupo OT foi diferente do grupo controle apresentando os menores valores de absorbância. No período de 72h, os grupos IG, HCI e IA foram iguais ao grupo controle sendo

os demais grupos diferentes entre si e o grupo controle. Nos tempos experimentais de 5 e 7 dias todos os grupos apresentaram valores de absorvância diferentes do grupo controle sendo que o grupo OT foi o que obteve menores valores de absorvância nesses períodos.

Na comparação dos tempos experimentais de cada medicação, pôde-se observar na figura 9 que para todos os grupos, 48h foi período menos citotóxico. O grupo HPG obteve comportamento semelhante ao grupo controle com relação a variação da absorvância pelo tempo e os grupos IG, HCI e IA foram iguais entre si na comparação da influência do tempo. Para o grupo HC, todos os tempos experimentais foram diferentes entre si, diferenciando do grupo OT que os valores da absorvância em 24h e 48h foram semelhantes, em 72h foi diferente dos dois tempos anteriores e em 5 e 7 dias foram os mais citotóxicos, com valores de absorvância semelhantes entre si.

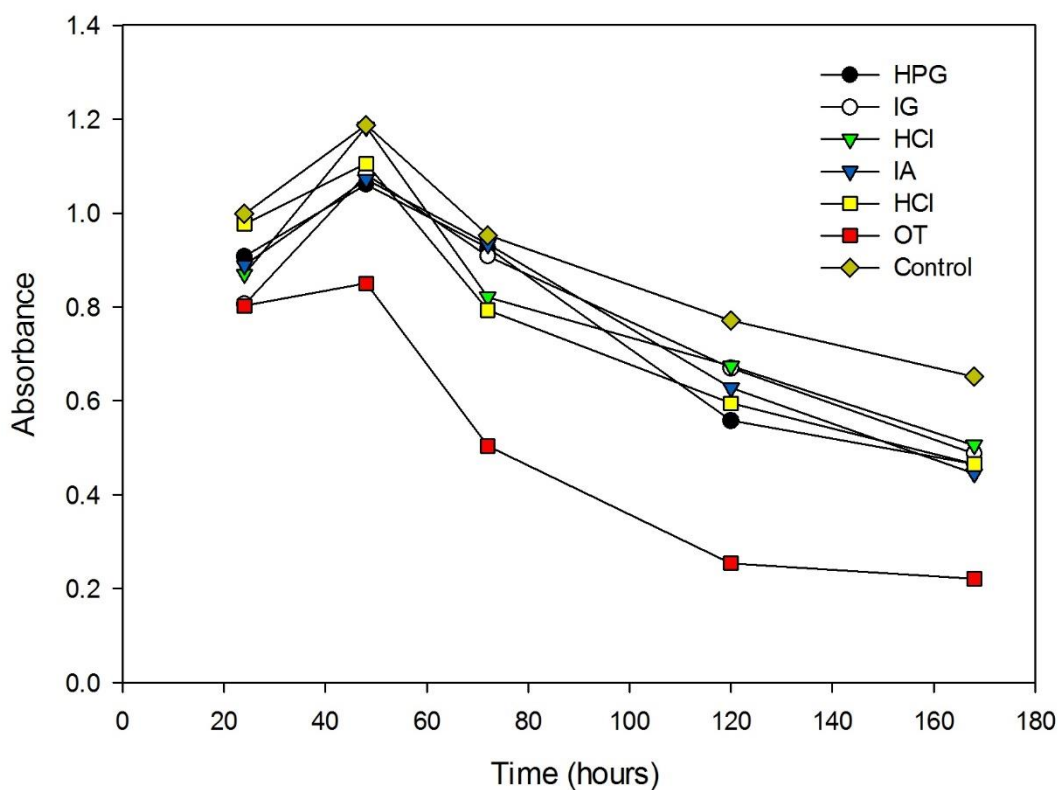


Figura 9. Relação valores de absorvância x tempos experimentais.

Foi observado que houve redução dos valores de absorvância em relação aos tempos experimentais para todos os grupos, porém no grupo OT obteve-se menores valores de absorvância durante toda a pesquisa.

6 DISCUSSÃO

Os medicamentos intracanaís necessitam apresentar biocompatibilidade, pois entram em contato direto com os tecidos periapicais durante o tratamento endodôntico e, por isso, podem induzir a morte celular, caso, sejam citotóxicos. Nesse estudo, objetivou-se analisar o efeito tóxico dos medicamentos intracanaís frente aos fibroblastos, principalmente, das pastas endodônticas a base de iodofórmio, devido à carência de pesquisas sobre citotoxicidade que envolvem esses materiais.

Quando se prepara o delineamento experimental de estudos de citotoxicidade, o tipo de célula é um fator importante a ser considerado. Alguns estudos têm utilizado células primárias que são obtidas a partir do próprio tecido e apresentam tempo de vida curto, enquanto em outros, células permanentes são utilizadas por apresentarem maior estabilidade, facilidade de manipulação e cultivo, e altas taxas de proliferação sem que haja alteração no fenótipo celular^{3,70}. Além disso, as células podem ser adquiridas a partir de humanos ou de murinos, não havendo diferenças nas respostas obtidas entre elas⁷¹. Neste estudo, foi utilizado uma linhagem de células permanentes de murinos (fibroblastos L929) adquiridas a partir de um banco de células.

Dentre os tipos celulares existentes, os fibroblastos são as células mais frequentemente empregadas em experimentos realizados com produtos odontológicos⁷⁵, principalmente quando o medicamento a ser testado entrará em contato com o tecido conjuntivo. No presente estudo, os fibroblastos foram escolhidos, por apresentarem-se em maior número nos tecidos periapicais e no ligamento periodontal, locais em que as medicações intracanaís, ou os produtos provenientes da sua degradação, exercem seus efeitos¹⁰. Essas células, ainda, apresentam a característica de serem as maiores produtoras de fibras colágenas dos tecidos e, por isso, participam ativamente do processo de reparação tecidual⁷⁴.

Nos ensaios de toxicidade utilizando células, as substâncias podem ser colocadas em contato direto ou indireto com a cultura celular, para sensibilizá-la⁷. Neste último caso, utiliza-se os eluatos preparados a partir das medicações analisadas, baseando-se no fato que, quando colocadas no interior dos condutos radiculares durante a prática clínica, os componentes das

medicações são liberados e diluídos nos fluidos tissulares, da mesma forma que ocorre com as substâncias que se difundem para o meio de cultura durante a preparação dos eluatos em pesquisas *in vitro*⁶³. Uma limitação desse estudo está na dificuldade em mensurar a quantidade de componentes liberados para o meio. Dessa forma, para uma maior semelhança com a clínica, esse estudo foi realizado de forma indireta, após as medicações intracanáis permanecerem em contato com o meio de cultura, liberando seus componentes e produzindo os eluatos dos medicamentos analisados.

Na literatura, os estudos com medicamentos intracanáis utilizando células apresentam diversos protocolos para a sua execução, sendo os tempos experimentais um dos parâmetros que mais apresentam variação. Assim, determinou-se os tempos experimentais de 24h, 48h, 72h, 5 e 7 dias, baseado no uso desses medicamentos na prática clínica e em pesquisas anteriormente realizadas na literatura que apresentavam o mesmo objetivo^{81,86}.

Alguns tipos de ensaios de citotoxicidade tem sido utilizados no meio científico para avaliar o potencial tóxico dos materiais endodônticos^{6,11,65,68}. No presente estudo, a viabilidade celular dos fibroblastos foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o reagente MTT. Esse ensaio, além de ser o mais utilizado em pesquisas com esse objetivo, foi escolhido para essa pesquisa por ser indicado pela ISO 10993-5⁷⁶ (2009) e por apresentar simplicidade de execução, rapidez, precisão e possibilidade de ser reproduzido⁷⁴. Contudo, Yadlapati et al.⁷⁸(2013) afirmaram que, a interpretação desse tipo de ensaio deve ser cautelosa, visto que, a avaliação acontece apenas por um único parâmetro celular, diferentemente do ensaio multiparamétrico que analisa o metabolismo mitocondrial, a permeabilidade da membrana celular e, a densidade e presença do DNA, ao mesmo tempo.

Neste estudo, todas as medicações analisadas, em algum momento da pesquisa, apresentaram menores valores de absorvância que o controle e, conseqüentemente, menor viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle demonstrando citotoxicidade sobre os fibroblastos L929. Apesar disso, algumas dessas medicações analisadas, como as associações hidróxido de cálcio-água destilada e iodofórmio-água destilada mostraram, através de cortes histológicos, que quando implantadas em tecido subcutâneo de ratos, induziam a reação inflamatória leve na região seguida de reparação tecidual^{39,47}.

A pasta de hidróxido de cálcio nas primeiras 48h não mostrou-se citotóxica, porém, a partir de 72h apresentou-se mais citotóxica que o grupo controle. Alguns estudos corroboram^{81,86} com esse achado que pode estar relacionado a pouca solubilidade e

difusibilidade do hidróxido de cálcio para o meio e, ao aumento do seu pH com o passar dos dias^{31,81} em ensaios laboratoriais. Alto pH promove desnaturação enzimática e destruição da membrana celular, levando a célula à morte⁷⁴. Entretanto, alguns autores discordaram desses achados demonstrando que o hidróxido de cálcio apresentou alta citotoxicidade em 24h e proliferação celular em 7 dias de contato com as células^{3,67,70,81,85}. Essa discrepância pode estar relacionada a diversidade de etapas dos protocolos existentes entre as pesquisas.

O PMCC livre de associação com outras substâncias tem demonstrado ser extremamente citotóxico^{56,87}. Entretanto, trabalhos experimentais em modelo animal demonstraram que quando o PMCC é associado ao hidróxido de cálcio e a glicerina na pasta HPG, essa toxicidade é reduzida a níveis compatíveis com os tecidos,^{40,41,59} não apresentando nem genotoxicidade e nem mutagenicidade⁵⁸. Altos valores de absorvância da pasta HPG também foi observada no presente estudo e pode ser creditada a pequena concentração de PMCC liberado para os tecidos, visto que, quando associado ao hidróxido de cálcio, o PMCC produz um sal pouco solúvel, o paramonoclorofenolato de cálcio, que libera lentamente o paramonoclorofenol e os íons Ca^{2+} e OH^- para o meio, não apresentando toxicidade ao tecidos⁵⁷. Além disso, essa pasta ainda apresenta em sua composição a glicerina que é um veículo viscoso, que permite lenta dissociação e difusão dos íons para o meio³².

A medicação iodofórmio-glicerina, no período de 24h, foi uma das medicações mais citotóxicas quando comparadas ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Petel et al.¹¹ (2013), no qual uma substância à base de iodofórmio e outros compostos, apresentou baixa viabilidade celular de macrófagos e células epiteliais.

Neste estudo observou-se que o tempo influenciou na viabilidade celular, demonstrando que todas as medicações intracanal apresentaram-se mais citotóxicas aos fibroblastos com o passar dos tempos experimentais. Deve ser ressaltado que o Otosporin® demonstrou ser a medicação intracanal mais citotóxica durante toda a pesquisa. Essa toxicidade foi observada por Miura et al.⁸⁷ (2010) na maior concentração utilizada por esses autores em sua pesquisa. Uma justificativa para isso pode estar no antibiótico polimixina B, presente no Otosporin®, que atua diretamente na membrana citoplasmática comprometendo as propriedades osmótica e os mecanismos de transporte da membrana celular, levando a morte da célula. Sua ação não apresenta seletividade e por isso, a polimixina B age também em células de humanos, uma vez que a composição da membrana plasmática desta é semelhante as das bactérias⁸⁸.

Dessa maneira, mais testes *in vitro* e *in vivo* necessitam ser realizados para definir se as diferentes associações de medicamentos intracanaais são biocompatíveis com os tecidos perirradicular de forma que possam continuar sendo utilizados na terapia endodôntica.

7 CONCLUSÃO

Diante da metodologia utilizada, conclui-se que todas as medicações intracaneais apresentaram comportamento similar ao grupo controle na maior parte da pesquisa, porém com 5 e 7 dias apresentaram-se mais citotóxica que o grupo controle. O Otosporin® demonstrou ser a medicação intracanal mais citotóxica em todos os tempos experimentais. Pôde-se observar também que o tempo influenciou no aumento da citotoxicidade de todas as medicações intracaneais analisadas.

REFERÊNCIAS

- 1 Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J.* 2009;20:32-6.
- 2 Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012;45:311-6.
- 3 Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *J Endod.* 2010;36:260-3.
- 4 Vieira AR, Siqueira Jr JF, Ricucci D, Lopes WSP. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod.* 2012;38:250-4.
- 5 Ricucci D, Loghin S, Siqueira Junior JF. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod.* 2013;39:712-8.
- 6 Zeferino EG, Bueno CES, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J.* 2010;43:843-8.
- 7 Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblasts cells by four root canal sealers. *J Endod.* 2012;45:49-56.
- 8 Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CHR. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012;38:495-500.
- 9 Hirshman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38:385-8.
- 10 Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KCS, Santos CF, Sipert CR. *In vitro* cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex and Portland Cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013;24:111-6.
- 11 Petel R, Moskovitz M, Tickotsky N, Halabi A, Goldstein J, Hourri-Haddad Y. Cytotoxicity and proliferative effects of iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Arch Oral Biol.* 2013;58:75-81.
- 12 Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran– Patologia: bases patológicas das doenças. 7ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.91-123.

- 13 Heward S, Sedgley C. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes simulated root surface resorption defects: An *in vitro* study using matched pairs of human teeth. *J Endod.* 2011;37:40-4.
- 14 Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC, Silva PIS. Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol.* 2012;28:306-13.
- 15 Ioannidis K, Thomaidis V, Fiska A, Lambrianidis T. Lack of periradicular healing and gradually increasing swelling two years after intentional extrusion of calcium hydroxide into periapical lesion: report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:e86-e91.
- 16 Pontius V, Pontius O, Braun A, Frankenberger R, Roggendorf MJ. Retrospective evaluation of perforations repairs in 6 private practices. *J Endod.* 2013;39:1346-58.
- 17 Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009;42:227-37.
- 18 Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Jaramillo DE, Duarte MAH. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral- infected dentin biofilm model. *J Endod.* 2013;39:115-8.
- 19 Siqueira Jr JF, Lopes HP, Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod.* 1998;24:11-4.
- 20 Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2010;43:419-23.
- 21 Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:e70-4.
- 22 Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2011;19:106-12.
- 23 Ballal NV, Kumar SR, Laxmikanth HK, Saraswathi MV. Comparative evaluation of different chelators in removal of calcium hydroxide preparations from root canals. *Aust Dent J.* 2012;57:344-8.
- 24 Souza RA, Silva-Souza YTC, Colombo S, Lago M, Duarte MAH, Pécora JD. Healing of a tooth with an overinstrumented apex, extensive transportation and periapical lesion using a 5mm calcium hydroxide apical plug: an 8 year follow-up report. *Braz Dent J.* 2012;23:608-11.

- 25 Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod.* 2013;39:980-3.
- 26 Komabayashi T, D'souza RN, Dechow PC, Safavi KE, Spanberg LSW. Particle size and shape of calcium hydroxide. *J Endod.* 2009;35:284-7.
- 27 Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy, with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:1823-33.
- 28 Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (Revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: A cases series. *J Endod.* 2011;37:1327-30.
- 29 Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *J Endod.* 2011;44:697-730
- 30 Yassen GH, Chin J, Mohammedsharif AG, Alsoufy SS, Othman SS, Eckert G. The effect of frequency of calcium hydroxide dressing change and various pre-and inter-operative factors on the endodontic treatment of traumatized immature permanent incisors. *Dent Traumatol.* 2012; 28:296-301.
- 31 Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, Lima RKP, Berbert FLVC, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol.* 2012;28:320-3.
- 32 Vianna ME, Zélio DM, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Concentration of hydrogen ions in several calcium hydroxide pastes over different periods of time. *Braz Dent J.* 2009;20:382-8.
- 33 Pavaskar R, Ataide IN, Chalakkal P, Pinto MJ, Fernandes KS, Keny RV, Kamath A. An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012;38:95-100.
- 34 Weckwerth PH, Carnietto C, Weckwerth ACVB, Duarte MAH, Kuga MC, Vivan RR. *In vitro* susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. *Braz Dent J.* 2012;23:192-8.
- 35 Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999;25:161-6.
- 36 Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, Kum KY, Han SH. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod.* 2011;37:191-6.

- 37 Nelson-Filho P, Bezerra Silva LA, Leonardo MR, Sabbag Utrilla L, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J*. 1999;32:303-311.
- 38 Camargo SEA, Rode SM, Prado RF, Carvalho YR, Camargo CHR. Subcutaneous tissue reaction to castor oil bean and calcium hydroxide in rats. *J Appl Oral Sci*. 2010;18:273-8.
- 39 Tomaz PJS, Farias MP, Piva MR, Albuquerque-Junior RLC, Ribeiro MAG. Effect of laser therapy in inflamed tissue by medications based on iodoform. *Am J Appl Sci*. 2013;10:81-8.
- 40 Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod*. 2002;28:295-9.
- 41 Silveira AMV, Lopes HP, Siqueira Jr JF, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J*. 2007;18:299-304.
- 42 Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *J Endod*. 2004;30:593-6. Ca^{2+} OH^-
- 43 Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108:628-32.
- 44 Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivian RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland Cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009;35:737-40.
- 45 Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod*. 2005;31:50-2.
- 46 Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2004;14:417-24.
- 47 Pallotta RC, Machado MEL, Reis NS, Martins GHR, Nabeshima CK. Tissue inflammatory response to implantation of calcium hydroxide and iodoform in the back of rats. *Rev Odont Cienc*. 2010;25:59-64.
- 48 Moskovitz M, Tickotsky N, Ashkar H, Holan G. Degree of root resorption after root canal treatment with iodoform containing filling material in primary molars. *Quintessence Int*. 2012;43:361-68.
- 49 Huang TH, Hung CJ, Chen YJ, Chien HC, Kao CT. Cytologic effects of primary tooth endodontic filling materials. *J Dent Sci*. 2009;4:18-24.

- 50 Holland R. Emprego da associação de corticosteroide-antibiótico durante o tratamento endodôntico. Rev Paul Odontol. 1980;1:4-7.
- 51 Fachin EVF, Scarparo RK, Pezzi AP, Luisi SB, Sant'ana M Filho. Effect of betamethasone on the pulp after topical application to the dentin of rat teeth: vascular aspects of the inflammation. J Appl Oral Sci. 2009;17:335-9.
- 52 Estrela C, Estrela CRA, Guimarães LF, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. J Appl Oral Sci. 2005;13:152-6
- 53 Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. Int Endod J. 2001;34:341-5.
- 54 Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC, Unterkircher CS. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005;33:107-14.
- 55 Ramos IFAS, Biz MT, Paulino N, Scremin A, Della Bona A, Barletta FB, Figueiredo JAP. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an *in vivo* study. J Appl Oral Sci. 2010;50-6.
- 56 Spangberg L, Rutberg M, Rydinge E. Biologic effects of endodontic antimicrobial agents. J Endod. 1979;5:166-75.
- 57 Anthony DR, Gordon TM, Del Rio CE. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982;54:560-5.
- 58 Gayva SMM, Siqueira Junior JF. Direct genotoxicity and mutagenicity of endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems. J Appl Oral Sci. 2005;13:387-92.
- 59 Grecca FS, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Borges MAG. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. J Endod. 2001;27:610-2.
- 60 Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC, Carvalho CAT, Oliveira LD, Menezes MM, Afonso SE, Mancini MNG. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. Dent Traumatol. 2006;22:302-6.
- 61 Lima RA, Carvalho CBM, Ribeiro TR, Fonteles CSR. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol on infected primary molars: A split-mouth randomized clinical trial. Quintessence Int. 2013;44:113-22.
- 62 Moraes AM, Augusto EFP, Castilho RL. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Rocca; 2007.p.503.

- 63 Lessa FCR, Aranha AMF, Hebling J, Souza Costa CA. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-BIO cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz Dent J.* 2010;21:24-31.
- 64 Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Response of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Materials.* 2002;18:318-23.
- 65 Baraba A, Zeljezic D, Kopjar N, Mladinic M, Anic I, Miletic I. Evaluation cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes *in vitro*. *Int Endod J.* 2011;44:652-61.
- 66 Cornélio ALG, Salles LP, Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod.* 2011;37:203-10.
- 67 Correa GTB, Veranio GAC, Silva LE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MFZ. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by trypan blue assay. *J Appl Oral Sci.* 2009;17:457-61.
- 68 Modareszadeh MR, Chogle AS, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, Shaikh S, Outbudin S. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J.* 2011;44:154-61.
- 69 Orban EO, Maden M, Senguüven B. Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation. *Int Endod J.* 2012;45:317-25.
- 70 Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012;38:1372-5.
- 71 Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line. *Int Endod J.* 2009;42:711-8.
- 72 Santos RL, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV, Ruellas ACO. Cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastomeric ligatures on L929 mouse fibroblasts. *Braz Dent J.* 2010;21:205-10.
- 73 Karapinar-Kazandag M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, Bayirli G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2011;44:626-34.
- 74 Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J.* 2012;45, 815-20.

- 75 Wheeler MA, Falvo J, Ruiz F, Byars M. Chlorhexidine, ethanol, lipopolysaccharide and nicotine do not enhance the cytotoxicity of a calcium hydroxide pulp capping material. *Int Endod J.* 2012;45:989-95.
- 76 International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices- tests for *in vitro* cytotoxicity. Suíça, 2009. 34p.
- 77 Zhang W, Li Z, Peng B. *Ex vivo* cytotoxicity of new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010;43:769-74.
- 78 Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2013;46:1-7.
- 79 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
- 80 Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod.* 1998;24:604-606.
- 81 Guigand M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J Endod.* 1999;25:419-23.
- 82 Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod.* 2004;30:359-61.
- 83 Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJD, Roberts S, Liewerh F, Joyce AP. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2005;31:613-5.
- 84 Silva RAB, Leonardo MR, Silva LAB, Castro LMS, Rosa AL, Oliveira PT. Effects of the association between a calcium hydroxide paste e 0,4% chlorexidine on the development the osteogenic phenotype *in vitro*. *J Endod.* 2008;34:1485-9.
- 85 Barbosa SV, Barroso CMS, Ruiz PA. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. *Braz Dent J.* 2009;20:118-21.
- 86 Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line *in vitro*. *Quintessence Int.* 2009;10:e55-61.
- 87 Miura CAS, Sá MS, Lima RS, Machado MAAM, Telles PDS. Avaliação da toxicidade de materiais endodônticos em células-tronco da polpa dentária. *Rev Odontol Bras Central.* 2010;19:192-5.
- 88 Neiva LBM, Fonseca CD, Watanabe M, Vattimo MFF. Polymyxin B: dose and time dependent nephrotoxicity effect *in vitro*. *Acta Paul Enferm.* 2013;26:57-62.

89 Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013;39:274-7.

90 Kuan YH, Li YC, Huang FM, Chang YC. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int Endod J.* 2012;45:619-26.

91 Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, Lin PS, Jeng JH. Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanoids production in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2012;45:848-58.

92 Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; e1-e7.

93 Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63. *J Endod.* 2010;36:40-4.

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