



FMUC

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos:  
estudo *in vitro***

Ana Patrícia Pagaime da Silva

Orientador: Professor Doutor Manuel Marques Ferreira

Co-orientadora: Mestre Mafalda Laranjo

Coimbra 2014



## **Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos: estudo *in vitro***

Silva A\*, Laranjo M\*\*, Ferreira M\*\*\*

\* Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

\*\* Assistente de investigação da FMUC

\*\*\* Professor Auxiliar com Agregação do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Área da Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Portugal

Tel.: +351 239 484 183

Fax.: +351 239 402 910

e-mail: [appagaiques@gmail.com](mailto:appagaiques@gmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** O estudo dos materiais dentários tem recebido crescente atenção pela possibilidade dos seus componentes afetarem os tecidos circundantes, interferirem no processo de cicatrização e/ou causarem reações alérgicas. Devem ser tomados cuidados especiais quanto aos materiais utilizados nos procedimentos endodônticos uma vez que os mesmos são colocados em contato direto com tecidos vivos como o ligamento periodontal e o osso alveolar.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo experimental consistiu na avaliação e comparação da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos *in vitro*, nomeadamente o Top Seal® e o MTA Fillapex®.

**Materiais e Métodos:** As células foram incubadas com várias concentrações de Top Seal®, considerado um “gold standard”, e MTA Fillapex®, tendo em conta as diretivas da norma ISO10993-5, durante 24, 72 e 120 horas, tendo sido realizados controlos negativos em todas as experiências. A avaliação da atividade metabólica foi realizada através do ensaio MTT, a avaliação do conteúdo proteico foi realizada através do ensaio da sulforrodamina B e a avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo.

**Resultados:** Para ambos os materiais foi verificada uma diminuição da atividade metabólica com o aumento da concentração dos meios condicionados. Na diluição de 1:8 observou-se uma ligeira diminuição da atividade metabólica, semelhante nos dois materiais às 24h, seguida de uma diminuição no MTA Fillapex® às 72h e 120h, com diferenças significativas ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respetivamente) quando comparado ao Top Seal®. Quanto à viabilidade celular, na diluição de 1:8 foi verificada uma diminuição às 24h para ambos os materiais. No entanto, às 72h e 120h ocorreu uma diminuição, com diferença significativa ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respetivamente), para o MTA Fillapex® quando comparado ao Top Seal® que recuperou, para valores próximos do controlo. Na avaliação dos tipos de morte celular foi observada uma menor citotoxicidade por parte do MTA Fillapex® às 24h, com um valor de células viáveis bastante superior ao verificado com o Top Seal® (82% e 36,6%, respetivamente). Às 72h foi verificada uma alteração dos resultados, com o Top Seal® a apresentar valores de viabilidade superiores ao MTA Fillapex (51,4% e 22,8%, respetivamente).

**Conclusão:** Dentro das limitações deste estudo *in vitro* podemos concluir que a citotoxicidade dos materiais é dependente da diluição do meio condicionado e do tempo de exposição. O cimento MTA Fillapex® foi associado a uma citotoxicidade significativamente maior. O Top Seal® mostrou ser um material biocompatível, com níveis baixos de citotoxicidade. Este material tende a ser menos citotóxico ao longo do tempo, aumentando a atividade metabólica e a viabilidade celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** The study of dental materials has received increasing attention since its toxic compounds may affect the surrounding tissues, interfere with the healing process and/or cause allergic reactions. Special attention must be taken regarding the materials used in endodontic procedures since they are placed in direct contact with living tissues, like periodontal ligament and alveolar bone.

**Objective:** The aim of this experimental study is to evaluate and compare the cytotoxicity of two root canal sealers *in vitro*, in particular Top Seal® and MTA Fillapex®.

**Materials and Methods:** Cells were incubated with various concentrations of Top Seal®, considered a "gold standard" and MTA Fillapex®, taking into account the guidelines of the standard ISO10993-5 for 24, 72 and 120 hours and negative controls were performed in all experiments. The assessment of metabolic activity was performed using the MTT assay, assessment of protein content was performed using the sulforhodamine B assay and assessment of the types of cell death was performed by flow cytometry.

**Results:** A decrease in metabolic activity was observed in both materials with higher extracts concentrations. At 1:8 dilution there was a slight decrease in metabolic activity, similar in both materials at 24h, followed by a decrease in MTA Fillapex® at 72h and 120h, with significant differences ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  respectively) compared to the Top Seal®. Cell viability, at a dilution of 1:8 suffer a decrease at 24h for both materials. Although, at 72h and 120h was verified a decrease, with significant differences ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively), to the MTA Fillapex® compared with Top Seal® which recovered. In the evaluation of types of cell death, lower cytotoxicity was observed by the MTA Fillapex® at 24h, with a value of viable cells significantly higher than the Top Seal® (82% and 36.6%, respectively). At 72h was observed a change in the results with Top Seal® presenting viability values higher than the MTA Fillapex® (51.4% and 22.8%, respectively).

**Conclusion:** Within the limitations of this *in vitro* study, we conclude that the cytotoxicity of the materials is dependent on the extract dilution and exposure time. MTA Fillapex® was associated with a significantly higher cytotoxicity. Top Seal® proved to be a biocompatible material, with lower levels of cytotoxicity. This material tends to be less cytotoxic over time, increasing the metabolic activity and cell viability.

## INTRODUÇÃO

A Endodontia assumiu uma importância crescente na Medicina Dentária dada a maior exigência e desejo dos doentes em manter os dentes naturais em função por mais tempo. A investigação nesta área do saber, permitiu consideráveis melhorias nos materiais e equipamentos ao dispôr dos profissionais para este tipo de tratamentos e possibilitou melhores resultados, com menores dificuldades e riscos.<sup>1</sup>

## Terapêutica Endodôntica

A Endodontia tem por objetivo eliminar a infecção dos canais radiculares e preencher o espaço ocupado pela polpa dentária, de forma a prevenir infiltrações por microorganismos e seus produtos, tanto a nível apical como coronal<sup>2-4</sup>, de modo a manter a saúde dos tecidos periapicais ou permitir a sua cicatrização. O tratamento endodôntico consiste num procedimento que decorre em várias fases, desde o diagnóstico à remoção do conteúdo pulpar, bem como a preparação biomecânica e desinfecção do espaço pulpar, criando assim condições para a sua obturação.<sup>3, 5</sup>

Uma vez que a completa desinfecção do espaço pulpar é impossível, torna-se de extrema importância a selagem dos túbulos dentinários com materiais obturadores, impedindo assim a infecção e/ou reinfeção dos canais e, conseqüentemente, dos tecidos periapicais<sup>3, 6,7</sup>. A obturação endodôntica, consiste no preenchimento tridimensional dos canais radiculares por materiais biocompatíveis e com adequadas propriedades físico-químicas, visando promover a sua impermeabilização, não interferindo e, preferencialmente, estimulando o processo de reparação dos tecidos perirradiculares.<sup>6,7,8-10</sup> O preenchimento inadequado dos canais pode levar a infiltrações que vão favorecer o aparecimento de reações inflamatórias crônicas e comprometer o sucesso do tratamento.<sup>9-11</sup>

As ramificações dos canais, como canais laterais, secundários e acessórios, podem estabelecer uma comunicação entre o canal principal e o ligamento periodontal assim como com o foramen apical.<sup>11</sup> Na prática clínica, para o preenchimento do sistema de canais radiculares é utilizado um material sólido (guta-percha ou caprolactona) associado a um material com características pastosas, o cimento endodôntico.<sup>9, 12, 13</sup> Apesar de haver uma variedade de materiais sólidos (materiais de núcleo sob a forma de cones), usados em conjunto com cimentos endodônticos, o método mais comum para obturação envolve a gutta-percha como material principal.

A gutta-percha é um polímero do metilbutadieno ou isopreno (1,4-poliisopreno), um isómero da borracha. A gutta-percha pode tornar-se mais plástica tanto pela ação do calor como pela ação de solventes como o clorofórmio, o que permite a sua adaptação às irregularidades das paredes do canal. Pode apresentar duas formas cristalinas distintas: alfa e beta. A maioria da gutta-percha disponível comercialmente encontra-se na forma beta e em formato de cones, que podem ser calibrados ou não, sendo que os cones calibrados têm diâmetros e conicidades determinados.

A composição básica dos cones de gutta-percha inclui: gutta-percha (19 a 20%), óxido de zinco (60 a 75%), substâncias para conferir radiopacidade - como o sulfato de bário (1,5 a 17%), e outras substâncias

como resinas, ceras e corantes (1 a 4%). Alguns fabricantes adicionam ainda agentes anti-microbianos como o hidróxido de cálcio, clorhexidina ou iodofórmio. Apesar de não ser possível a esterilização dos cones de guta-percha a quente estas devem ser esterilizadas antes do uso, colocando-as em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25% durante um minuto.

A guta-percha é biocompatível e não é citotóxica, no entanto os cones apresentam alguma citotoxicidade, provavelmente devido aos outros componentes adicionados, nomeadamente o óxido de zinco, que é libertado ao longo do tempo.<sup>14, 15</sup> Apesar de apresentar boas propriedades físico-químicas não permite um selamento completo do canal radicular, necessitando do auxílio de cimentos para proteger os túbulos dentinários e o foramen apical contra infiltrações microbianas<sup>3, 4, 6</sup>, pela adesão às paredes de dentina e preenchimento dos espaços vazios.

A obturação com guta-percha obriga ao uso de cimentos de selagem e, ainda que a guta-percha possa ter alguma toxicidade, os cimentos são normalmente o elemento mais tóxico da obturação. Na actualidade, vários tipos de cimentos endodônticos são usados em combinação com a guta-percha para preencher os canais radiculares após a sua preparação biomecânica. Independentemente da técnica escolhida, essa combinação é essencial para se obter um selamento hermético do sistema de canais radiculares.<sup>16</sup> A principal função do cimento, além de preencher espaços existentes é servir de meio de união entre a guta-percha e as paredes do canal radicular. Ao longo dos anos têm sido estudadas as propriedades que os cimentos endodônticos devem possuir para que exerçam um comportamento ideal na terapêutica canalar.

Actualmente há vários cimentos endodônticos comercialmente disponíveis, em diversas fórmulas tais como à base de óxido de zinco e eugenol; cimentos de ionómero; cimentos com hidróxido de cálcio; à base de resina epóxica e, mais recentemente, cimentos à base de trióxidos minerais. Porém, quando avaliamos o comportamento dos diferentes cimentos endodônticos que procuram aliar propriedades físicas, químicas e biológicas, verifica-se que cada tipo específico de cimento apresenta sempre vantagens e desvantagens. Grossman resumiu as propriedades mecânicas, físicas e biológicas ideais dos materiais de obturação: estabelecer um selamento hermético, exibir aderência de modo a promover uma boa adesividade com as paredes do canal, ser radiopaco, ser fácil de misturar, não sofrer contração ao tomar presa, não manchar as estruturas dentárias, ser bacteriostático ou pelo menos não estimular o crescimento bacteriano, apresentar um tempo de presa longo, ser insolúvel nos fluidos teciduais, ser biocompatível e ser solúvel em algum solvente comum.<sup>6, 7, 12, 15-21</sup>

Alguns autores <sup>6, 19, 20, 22, 23</sup> acrescentaram outras propriedades, nomeadamente: permitir um tempo de trabalho adequado, não desencadear resposta imune nos tecidos periapicais, não ser mutagénico nem carcinogénico, ter força coesiva, apresentar baixa viscosidade e boa molhabilidade para penetrar nos canais laterais, mas com uma certa viscosidade, de modo a não extravasar antes de tomar presa e estimular a reparação e selamento biológico pela deposição de tecido mineralizado. Os cimentos endodônticos são classificados quanto à sua composição em cimentos à base de óxido de zinco-eugenol, cimentos à base de hidróxido de cálcio, cimentos à base de resina, cimentos à base de silicone, cimentos à base de ionómero de vidro e cimentos à base de agregado de trióxidos minerais.

## Cimentos à base de óxido de zinco-eugenol

Há muitos anos que os cimentos à base de óxido de zinco-eugenol, na sua composição mais simples, óxido de zinco em pó e eugenol como líquido, ou noutras formulações, com adição de resinas, bário, paraformaldeído, corticóides, são dos mais utilizados na obturação dos canais radiculares.<sup>14</sup> O primeiro cimento à base de óxido de zinco-eugenol, introduzido por Rickert e Dixon surgiu na forma de pó/líquido e continha partículas de prata que lhe conferiam alguma radiopacidade.<sup>15</sup> O endurecimento ou presa dá-se por reação de ácido-base, em que o óxido de zinco actua como base e o eugenol como ácido, formando um sal quelato de eugenelato de zinco e água.<sup>3</sup> Após a presa do material, 5% da quantidade de eugenol permanece livre.

O eugenol apresenta actividade anti-bacteriana, efeito anestésico e anti-inflamatório, sendo também bactericida em concentrações relativamente altas. Os iões de zinco, uma vez que em concentrações elevadas são inibidores enzimáticos, também podem inibir o crescimento bacteriano.

Tanto o eugenol como os iões de zinco podem ter um efeito citotóxico. Os efeitos biológicos do eugenol variam com a sua concentração. As concentrações elevadas inibem o crescimento e a respiração, com a conseqüente morte celular; promovem alterações vasculares, como a vasodilatação e são neurotóxicas.<sup>14</sup> No entanto a quantidade de eugenol libertada de um cimento de óxido de zinco eugenol para além do ápice radicular é muito pequena, na gama das concentrações com efeitos benéficos, e diminui ao longo do tempo. Esta quantidade libertada vai depender também da técnica de obturação utilizada e do limite da obturação. A composição destes cimentos está descrita na tabela I :

**Tabela I** : Composição e marcas de cimentos à base de óxido de zinco eugenol.

Marcas	Composição <sup>3, 15</sup>	
	Pó	Líquido
Roth Sealer®		
Kerr PCS®	Óxido de zinco - 42%	Eugenol
ProcoSeal®	Resina Staybelite - 27%	
Endomethasone®	Subcarbonato de bismuto - 15%	
	Sulfato de bário - 15%	
	Borato de sódio, anidro - 1%	

Este tipo de cimentos apresenta algumas vantagens, como uma contração de polimerização (0,14%) inferior à dos cimentos à base de resinas, propriedades antimicrobianas a longo prazo, facilidade de manipulação, radiopacidade de 7 a 9,97mm Al, razão pó/líquido de 1:3 que leva a uma expansão volumétrica da guta-percha e estabilidade dimensional. No entanto também apresenta várias desvantagens como propriedades de selamento inferiores às observadas noutros tipos de cimentos, presença de formaldeído, um alergéneo classificado como altamente/extremamente tóxico e de eugenol, que inibe a

condução nervosa *in vivo* e solubilidade superior à verificada noutros tipos de cimentos, que pode levar a maiores microinfiltrações.

### Cimentos à base de hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio foi introduzido na Endodontia por Herman em 1920, devido às suas vantagens na reparação pulpar. Na área da Endodontia é sobretudo usado para procedimentos de proteção pulpar, como medicação intracanal, em algumas técnicas de apexificação e como componente de vários cimentos de obturação. A primeira vez que foi usado como cimento de obturação foi em 1940 por Rhoner.<sup>21</sup>

Para ter um efeito terapêutico, o hidróxido de cálcio tem que ser dissociado em iões cálcio e iões hidroxil, o que pode afectar a sua solubilidade e levar a uma incapacidade de correcto selamento.<sup>21</sup> A sua reacção de polimerização é complexa e pouco homogénea; o contato com a humidade origina uma superfície dura, mas a zona mais profunda da mistura pode permanecer com menor consistência, o que pode trazer alguns problemas em termos de citocompatibilidade.<sup>14</sup> As grandes vantagens na utilização do hidróxido de cálcio como cimento de obturação são a estimulação da mineralização dos tecidos periapicais, de forma manter a saúde e promover a cicatrização, e os seus efeitos antimicrobianos.

### Cimentos à base de resina

#### Resinas epóxicas

Este grupo de cimentos, desenvolvido por Andre Schroeder, consiste numa resina bis-fenol que usa metamina para polimerização (AH26). Uma vez que a metamina liberta formaldeído durante a reacção de polimerização, passou a usar-se como substituto uma mistura de aminas que permitiu a polimerização sem a formação de formaldeído, sendo o produto comercializado com o nome de AH Plus. Outras vantagens do AH Plus sobre o AH26 são o facto de apresentar uma rápida polimerização, maior radiopacidade, maior facilidade de remoção e baixa solubilidade.<sup>3, 14</sup> A composição destes cimentos está descrita na tabela II :

**Tabela II:** Composição e marcas de cimentos à base de resinas epóxicas.

Marcas	Composição <sup>3</sup>
AH Plus®	Diepóxido
AH 26®	Tungstato de cálcio
TopSeal®	Óxido de zircónica
2-Seal®	Aerosil
	Pigmentos
	1-adamantano amina
	N,N'-dibenzoilo-5-oxa-nonandiamina-1,9
	TCD-Diamina

Este tipo de cimentos apresenta algumas vantagens como o facto de ser fácil de manipular, apresentar uma radiopacidade de 6 a 9,3mm Al, estabilidade dimensional, baixa solubilidade, capacidade de

fluir para os orifícios dos túbulos dentinários e libertação mínima de formaldeído que provoca inibição de *Streptococcus mutans* após 20 dias e de *Actinomyces israelii* a qualquer intervalo de tempo, e ainda o facto de não apresentar genotoxicidade nem mutagenicidade.<sup>3, 5</sup> As desvantagens descritas são a ocorrência de inflamação aguda reversível da mucosa quando em contato com a pasta, dificuldade na remoção devido à melhor adesão à dentina e menor resistência à fratura quando usados com guta-percha se comparados ao Resilon/Realseal.

### Resinas de metacrilato

Os cimentos à base de resinas de metacrilato foram desenvolvidos à luz da adesão física e química às paredes da dentina e ao material de obturação central.<sup>14, 22</sup> Este tipo de cimentos trouxe a possibilidade de formação do efeito monobloco do material de obturação com a estrutura dentária. Este conceito é referido na literatura, com a vantagem de melhorar o selamento dos canais e a resistência do dente à fratura.<sup>22</sup> A composição destes cimentos está descrita na tabela III.

**Tabela III:** Composição e marcas de cimentos à base de resinas de metacrilato.

Marcas	Composição <sup>3</sup>
Hydron®	BisGMA
EndoREZ®	UDMA
Realseal®	Hidróxido de cálcio
Epiphany®	Sulfato de bário
Fibrefill®	Vidro de bário
Realseal SE®	Sílica
Metaseal®	HEMA
Smartseal®	

Este tipo de cimentos apresenta algumas vantagens como o facto de quando usados com Resilon formarem o monobloco que melhora o selamento, maior resistência à fractura que o AH Plus®, apresentarem uma polimerização mais lenta, o EndoREZ® ser tolerado pelo tecido conjuntivo e ósseo e apresentarem uma maior penetração intratubular que o AH Plus® e o Endo CPM® e serem mais facilmente removidos. No entanto também apresenta valores de *push-out* inferiores e valores de fator C superiores ou seja maior contração de polimerização. Estes cimentos estão associados à presença de monómero residual nos canais sendo que outro problema é o facto da sua resistência à fratura ainda não estar bem documentada.<sup>3, 22</sup>

### Cimentos à base de silicone

O primeiro cimento à base de silicone foi o Lee Endo-Fill®, que testava propriedades do silicone como a capacidade hidrofóbica, a estabilidade química e adesão. No entanto apresentava alguma toxicidade, que aumentava com o tempo. Mais tarde surgiu o RoekoSeal Automix® que é colocado no canal por meio de um aplicador que mistura o cimento na dosagem apropriada. O material polimeriza por completo, sem contração, independentemente da humidade e temperatura. O GuttaFlow® surgiu mais

recentemente, na tentativa de incorporar no cimento de obturação as qualidades da guta-percha. A guta-percha foi triturada em partículas muito pequenas e misturada nos componentes de um cimento à base de silicone. Uma das vantagens advogada é a sua capacidade de expandir ligeiramente (0,2%) durante a presa, melhorando a capacidade de selagem.<sup>10</sup> A composição destes cimentos está descrita na tabela IV :

**Tabela IV:** Composição e marcas de cimentos à base de silicone.

Marcas	Composição <sup>3</sup>
RoekoSeal®	Polidimetilsiloxano, Óleo de silicone, Óxido de zircónica
Gutta flow®	Polidimetilsiloxano, Óleo de silicone, Óxido de zircónica, Guta-percha

Este tipo de cimentos apresenta algumas vantagens como o facto de ser fácil de manipular, apresentar uma boa adaptação, ter uma solubilidade teoricamente nula, proporcionar um bom selamento do canal radicular, apresentar uma óptima biocompatibilidade, proteção contra reinfeção e uma excelente radiopacidade. Por outro lado a sua viscosidade leva a que tenha uma maior probabilidade de extrusão para os tecidos periapicais, e o GuttaFlow apresenta uma baixa molhabilidade e não adere quimicamente à dentina.

### Cimentos à base de ionómero de vidro

Os cimentos de ionómero de vidro tradicionais são constituídos por alumina, sílica, ácido polialcenóico e são autopolimerizáveis. Estes têm sido utilizados para obturação devido às suas propriedades de adesividade dentinária, anti-microbianas e capacidade de adesão à estrutura dentária. No entanto, parecem ativar a libertação de prostaglandinas nos tecidos periapicais, deixar ocorrer alguma infiltração e desintegração. O Ketac-Endo® (3M/Espe, Minneapolis, MN) permite a adesão entre o material e as paredes do canal. A desvantagem do ionómero de vidro envolve a sua remoção, se for necessário o retratamento, o facto de possuir actividade antimicrobiana mínima e a elevada citotoxicidade que mostraram em culturas celulares, imediatamente após a mistura.<sup>9, 10</sup>

### Cimentos à base de agregado de trióxidos minerais

O Agregado Trióxido Mineral (MTA) é reconhecido como um material bioactivo, que promove a formação de tecidos duros e é biocompatível.<sup>8, 10</sup> Consiste num pó que contém pequenas partículas hidrofílicas, que tomam presa em contato com humidade.<sup>20, 23</sup> É composto basicamente por 75% de cimento Portland, 20% óxido de bismuto e 5% de gesso.<sup>7, 18, 19, 24, 25</sup> O seu componente principal, o cimento de Portland, é formado por silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato de cálcio e aluminoferrato tetracálcico.<sup>7, 23</sup> Desde a sua introdução em 1993 por Torabinejad, vários estudos têm sido publicados sobre as suas propriedades.<sup>7, 13, 23, 26-28</sup>

A sua biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, propriedades antimicrobianas, baixa microinfiltração e a sua capacidade de tomar presa em ambientes com humidade constituem algumas das suas vantagens.<sup>13, 17, 20</sup> Devido a estas propriedades tem sido usado para várias aplicações na Medicina Dentária como

material de retro obturação, formação de plug apical, material de reparação de perfurações radiculares e como material usado para proteções pulpares.<sup>5, 7, 8, 13, 18, 23, 29-32</sup> Contudo e apesar das suas características favoráveis, o MTA não apresenta propriedades físicas adequadas para ser usado como cimento endodôntico.<sup>17, 26, 33</sup> A manipulação do MTA é feita com água destilada na proporção 3:1 (pó:líquido), até se formar um gel coloidal que atinge a sua presa em 2h 45min. O seu pH é de 12,5 após tomar presa, sendo semelhante ao do hidróxido de cálcio.<sup>7, 25</sup> A sua principal vantagem é a sua elevada actividade antimicrobiana, apresentando boa capacidade de selamento, bioactividade (capacidade para formar uma camada de apatite tipo osso) estabelecendo uma ligação química com os tecidos vivos e biocompatibilidade. Tais propriedades podem ser alteradas de acordo com o tipo de MTA, a proporção pó/líquido, o método de mistura, a pressão exercida na sua compactação, a humidade, o pH e a temperatura do meio, a espessura de material e a forma como é levado ao local de aplicação.

Há, portanto, várias vantagens em usar o MTA como cimento endodôntico uma vez que este é altamente biocompatível; estimula a mineralização; é bioactivo ou seja induz a formação de tecidos duros por promover a diferenciação e migração de células produtoras dos mesmos; apresenta actividade antimicrobiana contra *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *E. faecalis* devido ao seu pH alcalino.<sup>7</sup> É também um mediador da produção de citocinas; promove um selamento biológico pela formação de hidroxiapatite na superfície do MTA; exhibe alta adesividade à dentina; forma hidróxido de cálcio, que liberta iões de cálcio para a fixação e proliferação celular; não é mutagénico nem neurotóxico; é radiopaco; não sofre contração de polimerização. É um material que não é sensível a contaminações por líquidos (incluindo sangue) e como cimento promove um selamento efetivo da dentina e cimento, promovendo uma reparação biológica e regeneração do ligamento periodontal.<sup>19, 26</sup> No entanto o seu uso pode provocar descoloração dentária devido à libertação de iões ferro e é um material difícil de manipular uma vez que apresenta um longo tempo de presa, de aproximadamente 2h 45 minutos e um curto tempo de trabalho, cerca de 4 minutos. Também apresenta uma força de compressão inadequada e não tem qualquer solvente conhecido.<sup>7, 8, 19, 25</sup> Os cimentos à base de MTA surgiram na tentativa de aproveitar os seus excelentes resultados como material de reparação tão amplamente utilizado e ultrapassando algumas das suas limitações (como a dificuldade de manipulação, reduzido tempo de trabalho e dificuldade de remoção).<sup>5, 8, 10, 30, 32, 34, 35</sup> A composição destes cimentos está descrita na tabela V:

**Tabela V:** Composição e marcas de cimentos à base de agregado trióxidos minerais.

Marcas	Composição <sup>3</sup>
Endo CPM <sup>®</sup>	MTA 50% (SiO, K <sub>2</sub> O, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SO <sub>3</sub> , CaO e Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
MTA-Obtura <sup>®</sup>	SiO <sub>2</sub> 7%, CaCO <sub>3</sub> 10%, Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 10%, BaSO <sub>4</sub> 10%
ProRoot Endo <sup>®</sup>	Alginato de propileno glicol 1%
MTA Fillapex <sup>®</sup>	Propileno glicol 1%, Citrato de sódio 1% Cloreto de cálcio 10%

Este tipo de cimentos apresenta algumas vantagens como a sua alta biocompatibilidade; o facto de estimular a mineralização, promover a deposição de cristais tipo apatite no terço médio e apical do canal e apresentar forças de *push out* elevadas e libertação de iões cálcio.<sup>29</sup> Contudo também apresenta algumas

desvantagens como o facto de não se unir à dentina nem ao material do núcleo; a alcalinidade do MTA poder, teoricamente, enfraquecer a dentina radicular e em casos de extrusão estarem associados a quadro de dor.<sup>7</sup>

## Avaliação da citotoxicidade

O estudo dos materiais dentários tem recebido crescente atenção dado os seus compostos tóxicos poderem afectar os tecidos circundantes, interferir no processo de cicatrização e/ou causar reacções alérgicas. Quanto aos materiais utilizados nos procedimentos endodônticos deve-se tomar cuidados especiais uma vez que os mesmos são colocados em contacto directo com tecidos vivos como a polpa dentária, ligamento periodontal e osso alveolar.<sup>15,36</sup> Estes materiais entram em contacto com os tecidos circundantes através dos túbulos dentinários, canais laterais e foramina<sup>13, 18, 37</sup> e estão, maioritariamente, em contacto com remanescentes celulares odontogénicos e osteogénicos nos quais provocam alguns efeitos como citotoxicidade, inflamação ou proliferação.<sup>13,13</sup> Tais condições podem levar à degeneração do tecido adjacente ao cimento e podem também atrasar a cicatrização.<sup>13, 38</sup> Logo, os cimentos devem ser não tóxicos, não mutagénicos e imunologicamente compatíveis com os tecidos periapicais.<sup>2</sup>

Quando há introdução de novos cimentos endodônticos no mercado é necessário testar as suas características e compará-las com materiais já regularmente usados e cujos efeitos já foram testados.<sup>39, 40</sup> Geralmente, a citocompatibilidade dos cimentos é testada com técnicas de cultura celular, que usam linhas celulares já estudadas.<sup>13</sup>

A citotoxicidade é um fenómeno complexo, que pode levar a um largo espectro de efeitos, desde a morte celular até alterações metabólicas. Alguns estudos podem classificar um material como não-citotóxico pois este não altera a proliferação celular, actividade mitocondrial ou a síntese de DNA. Contudo, o material testado pode alterar algumas vias metabólicas, as quais o ensaio não consegue detectar.<sup>41, 42</sup>

Dentro das várias metodologias recomendadas para estudar a biocompatibilidade e citotoxicidade de materiais dentários em diferentes níveis de investigação, os testes de cultura celular *in vitro* são parte dos protocolos iniciais mais usados. Estudar a citotoxicidade é um passo fundamental pois permite perceber o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico. O documento de regulamentação que padroniza os testes de citotoxicidade *in vitro* e selecciona os métodos mais adequados é a ISO 10993-5, estabelecida em 1992.<sup>31</sup> Os testes de citotoxicidade *in vitro* apresentam várias vantagens, das quais se destaca a possibilidade de controlo do ambiente químico como o pH, a temperatura e a pressão; controlo das condições fisiológicas como as concentrações de nutrientes e de hormonas; padronização da metodologia; replicação e variabilidade; controlo da dose, concentração e tempos de exposição; rapidez e custos.<sup>43</sup> Além disto, não trazem as preocupações éticas inerentes aos estudos em animais e estudos clínicos.<sup>43</sup>

Contudo é reconhecido que estes testes apresentam algumas limitações como o fato de ser necessária alguma experiência para realizar este tipo de estudos uma vez que estes ocorrem sempre em ambiente estéril devido ao perigo de contaminações. Neste tipo de testes também se usa células em

monocamadas, o que não é fisiológico e não reproduz a arquitetura tecidual *in vivo*, na qual as células basais podem ajudar na reparação da agressão à superfície, ou seja, estes testes decorrem sem qualquer contato com o organismo, logo as várias interações complexas que constituem a resposta biológica estão ausentes.<sup>31, 32, 43</sup> Temos também de ter em atenção que a presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material seja citotóxico quando aplicado *in vivo*.<sup>9</sup> Por outro lado, a ausência de efeito citotóxico *in vitro* pode garantir uma boa resposta clínica, a nível de biocompatibilidade.<sup>2, 31</sup>

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo experimental consistiu na avaliação e comparação da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos *in vitro*, nomeadamente o Top Seal® e o MTA Fillapex®.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a citotoxicidade de dois cimentos utilizados na obturação dos canais radiculares (MTA Fillapex® e Top Seal®) e efetuar o seu estudo comparativo. Procedeu-se à realização de estudos *in vitro* com uma linha celular de fibroblastos humanos (HFF1).

### Culturas celulares

Foram utilizados fibroblastos humanos HFF1 obtidos da *American Type Culture Connection* (ATCC® SCRC-1041), cultivados de acordo com as recomendações do fornecedor. As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C em atmosfera húmida, com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, em incubadora HeraCell 150. Para cultura e ampliação foi utilizado meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - D564 - Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco® 2010-09), 100µM de piruvato de sódio (Gibco® – 11360) e 1% de antibiótico (100U/ml de penicilina e 10U/ml de estreptomicina; Gibco® 15140-122).

### Preparação do meio de cultura

Para preparação deste meio de cultura (500ml DMEM com 10%FBS) procedeu-se à pesagem de 6,7g de DMEM em pó e 1,25g de bicarbonato de sódio, que depois de diluído em água ultra-pura, o pH foi regularizado a 7,4 com recurso a soluções concentradas de Hidróxido de sódio (NaOH) e Ácido clorídrico (HCl). Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, foram adicionados 1,25mL de piruvato de sódio, 5mL de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) e 50mL de FBS (Soro Bovino Fetal, do inglês, Fetal Bovine Serum). Finalmente filtrou-se a solução. De modo a permitir a manutenção das culturas e estimular o crescimento celular foram utilizados frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área com 15mL de DMEM suplementado com 10% de FBS.

### Preparação de placas para experiências

Para o procedimento de subcultura e preparação de experiências, as soluções de meio de cultura, do PBS (Tampão Fosfato Salino, do inglês, Phosphate Buffered Saline) e da tripsina foram aquecidas em banho-maria, a 37°C. Todos os procedimentos foram realizados em camara de fluxo laminar. Para a desagregação das células do substrato, foi efetuada a sua lavagem com PBS e foi adicionada tripsina. Após confirmação ao microscópio que as células se encontravam destacadas foi colocado meio de cultura nos frascos, de modo a inibir a tripsina e o conteúdo foi suspenso de modo a ficar homogéneo.

A suspensão celular foi colocada num tubo de falcon e centrifugada a 1000G, durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R) após o que se descartou o sobrenadante. Procedeu-se à suspensão do *pellet*, numa quantidade de meio conhecida. Utilizou-se uma alíquota de suspensão celular que foi homogeneizada

com quantidade igual de Azul de Tripano num *ependorf*. Ressuspendeu-se o conteúdo do *ependorf* e, com o auxílio de uma micropipeta, colocou-se parte do seu conteúdo na câmara de *Neubauer*.

Após a contagem das células e o cálculo da sua média pudemos obter a concentração celular que tínhamos no tubo de *falcon*. Aplicando a fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , as suspensões celulares foram ajustadas à concentração pretendida de modo a distribuir 200µL para cada poço da placa de 96 poços. As placas foram incubadas *overnight* para permitir a adesão das células aos poços e só depois foram iniciadas as experiências.

## Preparação dos meios condicionados e diluições

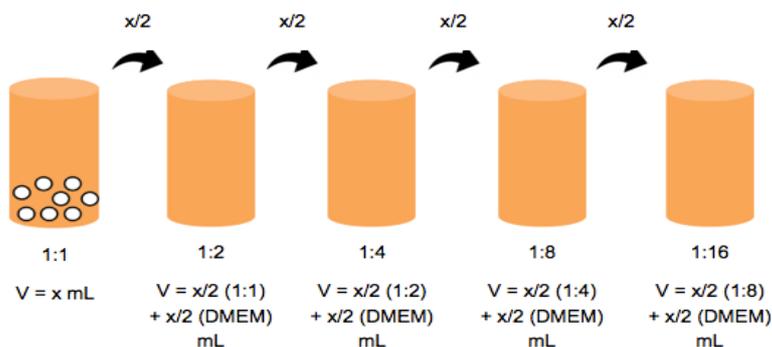
De forma a analisar a resposta celular aos cimentos endodônticos nos ensaios de citotoxicidade (MTT, SRB e citometria) foram estabelecidos dois grupos: G1 correspondente ao cimento TopSeal® (Densply, Maillefer; Ballaigues, Switzerland) e G2 correspondente ao cimento MTA Fillapex® (Angelus, Londrina; PR, Brazil). A composição destes materiais está descrita, de acordo com os fabricantes, na tabela VI:

Tabela VI: Composição dos cimentos endodônticos usados nos testes de citotoxicidade.

Cimentos endodônticos	Composição
Top Seal® (Densply Maillefer, Ballaigues, Switzerland)	Resinas epoxi, Tungstato de cálcio, Óxido de zircônica, Sílica, pigmentos de óxido de ferro, dibenzildiamina, Aminoadamantano, Óleo de silicone, Triciclodecano-diamina
MTA Fillapex® (Angelus, Londrina, PR, Brazil)	Resina de salicilato, Resina diluente, Resina natural, Óxido de bismuto, Sílica nanoparticulada, Agregado trióxido mineral, Pigmentos

Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar de modo a evitar riscos de contaminação bacteriana durante os testes de citotoxicidade. Os cimentos foram diretamente colocados em placas de PVC com furos por forma a obter *pellets* com 3mm de diâmetro e 1,5mm de altura. Seguidamente as placas foram colocadas na incubadora a 37°C com atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h para o TopSeal® e 72h para o MTA Fillapex®, para permitir a tomada de presa dos cimentos. De forma a diminuir os riscos de contaminação, os *pellets*, após serem removidos das placas de PVC e colocados em placas de 6 poços, mantiveram-se sob lâmpada de UV durante 20 minutos por cada face.

De seguida foram preparados os meios condicionados: para cada grupo (G1 e G2) foram colocados *pellets* em tubos de *falcon* com DMEM com 10% FBS, de forma a cumprir as recomendações da ISO 10993-5 - 82,4mm<sup>2</sup> de cimento por mL de meio de cultura, que de seguida foi colocado na incubadora, a 37°C durante 24h. Após 24h para cada solução inicial (1:1) foram realizadas quatro diluições (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), onde metade do volume da solução inicial foi diluída em igual volume de meio de cultura (DMEM com 10% FBS) num tubo de *falcon*, formando assim a diluição de 1:2. As diluições seguintes foram realizadas da mesma forma.



**Figura 1:** Esquema representativo da elaboração dos meios condicionados.

## Avaliação da atividade metabólica

Para os testes de citotoxicidade, os meios condicionados e as suas diluições foram colocados em contato com fibroblastos humanos (HFF1). Para tal, 24 h após o plaqueamento, já com os fibroblastos aderidos ao fundo dos poços, o meio de cultura foi removido e as culturas celulares foram expostas a 200µL de solução de meio condicionado e suas diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Em todos os estudos foram realizados controlos que corresponderam a culturas celulares incubadas com o mesmo volume de DMEM, com 10% FBS. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> durante 24h, 72h e 120h.

Após estes períodos a atividade metabólica foi determinada pelo ensaio do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), (5mg/ml; Sigma® M2128), um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de células metabolicamente activas reduzirem, no meio intracelular, o sal solúvel de tetrazólio dando origem a cristais de *formazan*, que é um produto de cor azul escura, insolúvel em água.

Como já referido, foi efetuado ensaio do MTT em meio condicionado referente às 24h, 72h e 120h. Para cada análise da atividade metabólica (24h, 72h e 120h) foram plaqueadas duas placas de 96 poços (Sartedt® 83.1835), cada uma contendo meio condicionado com TopSeal® ou com MTA Fillapex® em diferentes concentrações e meio de cultura DMEM (controlo - CT). A distribuição das soluções nas placas de 96 poços foi a seguinte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B						CT						
C						1:16						
D						1:8						
E						1:4						
F						1:2						
G						1						
H												

**Figura 2:** Quadro exemplificativo da distribuição dos meios condicionados e suas diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) nas placas de 96 poços relativamente ao ensaio de MTT.

Em cada placa, 18 poços foram distribuídos em 6 linhas horizontais (3 poços/linha). A cada poço foram adicionados 200 µl de meio condicionado, seguindo-se a ordem de concentrações descrita na figura. A primeira linha, ou seja a linha B continha apenas DMEM, servindo como controlo (CT). Em toda a volta, foi preenchida uma linha completa apenas com DMEM, de modo a garantir condições de humidade semelhantes entre os poços. O procedimento foi o seguinte:

Após remoção do meio dos poços com células, procedeu-se à lavagem de cada poço com 50 µL de PBS. Foram colocados 50 µL de solução de MTT em PBS em cada poço e as células incubadas a 37°C, no escuro, *overnight*. Após o período de incubação com a solução salina de MTT, os cristais de *formazan* são dissolvidos numa solução de HCl 0,04M em isopropanol (Isopropanol ácido), por forma a facilitar a dissolução. As placas foram deixadas em agitação por um período de 30 min e o seu conteúdo foi resuspendido com auxílio de uma micropipeta.

Por fim foi determinada a absorvância num comprimento de onda de 570 nm e usando como referência o comprimento de onda de 620 nm, num leitor automático de microplacas de cultura, utilizando o espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

Este ensaio colorimétrico constitui uma forma de avaliar a função mitocondrial, uma vez que o composto é reduzido por células metabolicamente ativas, devido à ação das enzimas desidrogenases, principalmente através da ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase (SDH) ou succinato-coenzima Q redutase.

Verifica-se que as desidrogenases, no meio intracelular, têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de *formazan*. Estes cristais de *formazan* podem posteriormente ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de *formazan* obtidos é diretamente proporcional à atividade metabólica.

A atividade metabólica foi expressa em percentagem relativamente às culturas celulares controlo não submetidas a qualquer tratamento.

## **Avaliação da viabilidade celular**

O ensaio SRB constitui um marcador de citotoxicidade muito sensível. A sulforodamina B (SRB) é um corante aniónico que se vai ligar às proteínas electrostaticamente. O corante fixado, medido espetofotometricamente após solubilização, correlaciona-se com o conteúdo proteico e, previsivelmente, com a viabilidade celular.

O ensaio do SRB foi realizado em culturas celulares submetidas à incubação com os meios condicionados correspondentes às diluições 1:2, 1:8 e 1:16 durante 24h, 72h e 120h. Para cada análise (24h, 72h e 120h) foi plaqueada uma placa de 96 poços (Sartedt® 83.1835), contendo meio condicionado com TopSeal® e com MTA Fillapex® em diferentes concentrações e meio de cultura DMEM (controlo - CT). A distribuição das soluções nas placas de 96 poços foi a seguinte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					CT							
C					1:16							
D					1:8							
E					1:2							
F												
G		Top Seal®				MTA Fillapex®						
H												

**Figura 3:** Quadro exemplificativo da distribuição dos meios condicionados e suas diluições (1:2, 1:8 e 1:16) nas placas de 96 poços relativamente ao ensaio de SRB.

Em cada placa, 9 poços foram distribuídos em 3 linhas horizontais (3 poços/linha) para cada material. A cada poço foram adicionados 200 µL de meio condicionado, seguindo-se a ordem de concentrações descrita na figura. A primeira linha, ou seja a linha B continha apenas DMEM, servindo como controlo (CT). Em toda a volta, foi preenchida uma linha completa apenas com DMEM, de modo a garantir condições de humidade semelhantes entre os poços.

Após remoção do meio condicionado dos poços com células, procedeu-se à lavagem de cada poço com 50 µL de PBS. Foram colocados 50 µL de solução de ácido acético a 1% (em metanol 100%) por poço, para promover a fixação das células e permaneceram em repouso, no frigorífico, durante 1 h. De seguida a solução de fixação foi removida e os poços lavados com água ultra-pura, de modo a remover os sais. Após secagem, foram adicionados 50 µL de SRB 0,4% (em ácido acético a 1%) a cada poço e deixados a incubar à temperatura ambiente, protegendo da luz, *overnight*. Após o período de incubação efetuou-se nova lavagem, com água corrente, até se eliminar completamente o corante não ligado. Deixou-se secar por 30 minutos e foram adicionados 100 µL de Tris NaOH 10mM com pH=10.

Por fim foi determinada a absorvância num comprimento de onda de 540 nm e usando um filtro de referência de 690 nm, num leitor automático de microplacas de cultura, utilizando o espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

## Avaliação dos tipos de morte celular

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Consiste num método que permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão com recurso a um aparelho, com um feixe de luz de um único comprimento de onda que é direcionado para um meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (forward scatter, FCS) e vários perpendiculares a este (side scatter, SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma específica e os corantes químicos fluorescentes encontrados

na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana).

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar o efeito dos sensibilizadores estudados ao nível da morte celular. Assim foram determinados e caracterizados os níveis de morte celular através da dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo (IP).

Para a realização dos estudos de citometria de fluxo as culturas celulares foram preparadas à semelhança do descrito para a avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT e SRB. Resumidamente, as culturas celulares foram incubadas durante 24 e 72 horas em placas de 6 poços com 2,5mL da diluição dos meios condicionados de 1:8, escolhida com base nos resultados preliminares de avaliação da atividade metabólica pelo ensaio do MTT. Realizaram-se controlos em todos os ensaios.

Para a análise da morte celular foram utilizados dois fluorocromos diferentes, a An-V e o IP, que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A An-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. De forma complementar, o IP é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose.

Desta forma, recorrendo à dupla marcação com An-V/IP é possível distinguir quatro grupos de células, **grupo I** a que correspondem as células vivas; - **grupo II** que engloba as células que se encontram em apoptose inicial; - **grupo III** que associa as células que se encontram em apoptose tardia/necrose; - **grupo IV** que contém as células que se encontram em necrose.

Deste modo, as células pertencentes ao grupo I, isto é, as células vivas, apresentam-se negativas tanto para a marcação com An-V como para a marcação com IP. As células incluídas no grupo II, em apoptose inicial, apresentam-se positivas para a marcação com An-V e negativas para a marcação com o IP. As células que se apresentam positivas para as duas marcações, significa que se encontram em apoptose tardia/necrose, pelo que compõem o grupo III, enquanto as células que se encontram em necrose e constituem o grupo IV apresentam-se negativas para a marcação com An-V e positivas para a marcação com o IP, de acordo com a tabela VII:

**Tabela VII:** Padrões de marcação com An-/IP para os diferentes grupos de células.

<b>Grupos</b>	<b>Anexina V</b>	<b>Iodeto de propídeo</b>
Grupo I <b>Células vivas</b>	-	-
Grupo II <b>Células em apoptose inicial</b>	+	-
Grupo III <b>Células em apoptose tardia/ necrose</b>	+	+
Grupo IV <b>Células em necrose</b>	-	+

Para marcação com An-V/IP, utilizaram-se células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 1000G durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* uma vez com PBS. Posteriormente, o *pellet* foi incubado com 100µL de tampão de ligação (KIT Immunotech), 1µL de An-V-FITC (KIT Immunotech) e 5µL de IP (KIT Immunotech), durante 15 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 400µL de PBS e efetuou-se a análise no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para a An-V-FITC e 640nm para o IP. Os resultados aparecem sob a forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada pelo cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

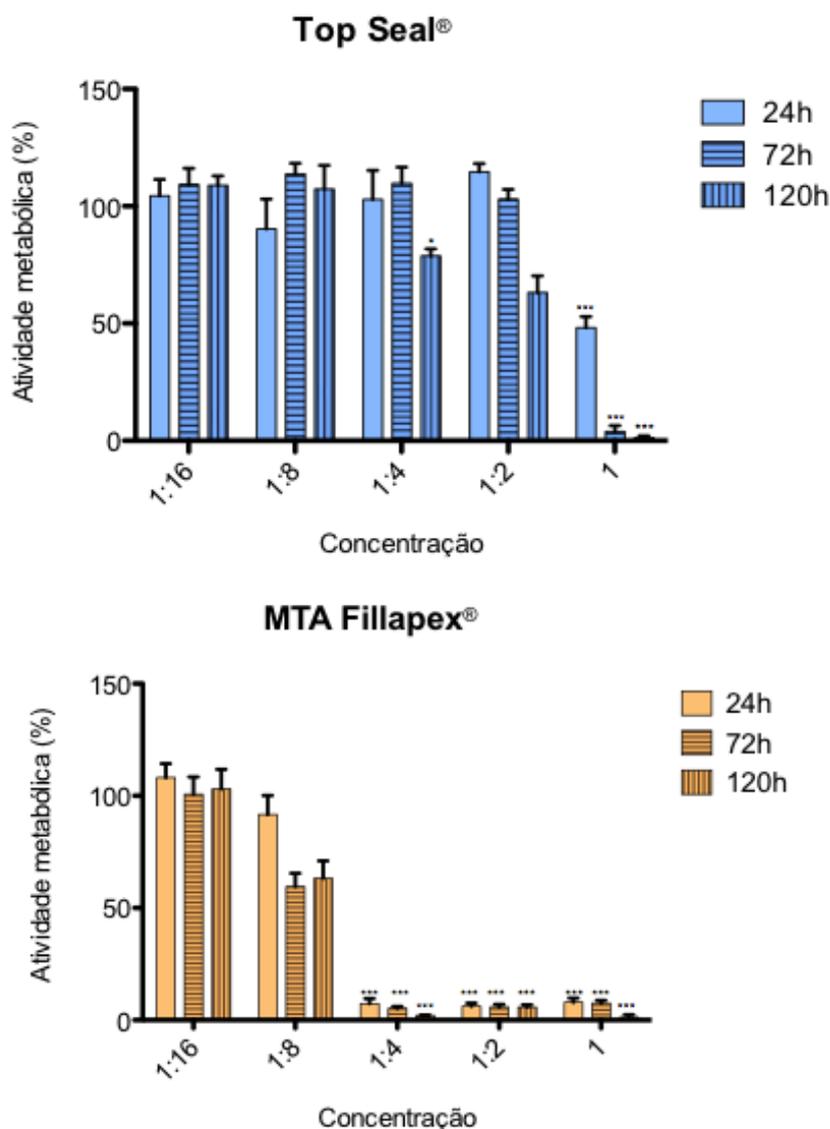
A comparação dos valores obtidos pelo ensaio MTT e SRB pem cada condição com o controlo foi realizado utilizando o teste *t* de Student para uma média, comparando com o valor de padronização (100 para o teste MTT e 1 para o teste SRB). Nas comparações entre as condições experimentais duas a duas foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário. Todas as comparações foram corrigidas pelo método de Bonferroni.

Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

## RESULTADOS

### Avaliação da atividade metabólica

Para avaliação da atividade metabólica dos materiais utilizados em culturas celulares de fibroblastos humanos, foram utilizados os meios condicionados e respectivas diluições, realizando-se posteriormente o ensaio do MTT. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. Na figura 4 está representada graficamente a resposta aos meios condicionados e respectivas diluições para cada um dos materiais às 24h, 72h e 120h.



**Figura 4:** Atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento com várias diluições de meios condicionados de TopSeal® e MTA Fillapex® às 24, 72 e 120 horas. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, \*\* e \*\*\* sendo que indicam, respetivamente, um  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

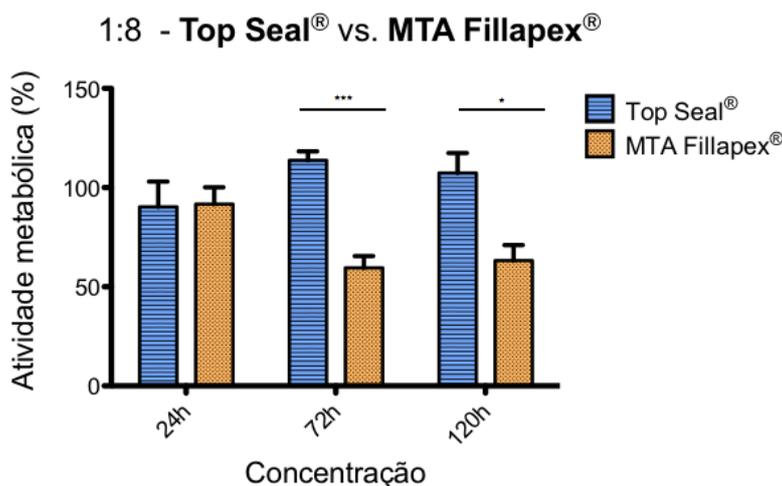
No geral verifica-se uma diminuição da atividade metabólica, ou seja um aumento da citotoxicidade, com o aumento da concentração dos meios condicionados.

Para a diluição de 1, em ambos os compostos e a todos os tempos de incubação (24h, 72h e 120h) foi observada uma diminuição da atividade metabólica significativa ( $p < 0,001$ ). O mesmo foi observado nas diluições de 1:2 e 1:4 do MTA Fillapex®, com diferença significativa do controlo ( $p < 0,001$ ).

Para o Top Seal®, na diluição de 1:2 foi verificado um aumento da atividade metabólica às 24h ( $114,6 \pm 3,2\%$ ) seguido de um decréscimo progressivo até às 120h ( $63,2 \pm 5\%$ ), sem diferenças significativas quando comparado ao controlo. Na diluição de 1:4, apesar de não haver diferenças significativas até às 72h, ocorre diminuição significativa da atividade metabólica às 120h ( $p < 0,05$ ). Para a diluição de 1:8 e de 1:16 não se verificaram alterações da atividade metabólica.

O MTA Fillapex®, às 24h e nas diluições de 1:16 e 1:8 também não mostrou diferenças com o controlo. De seguida foi observada uma diminuição da viabilidade celular, às 72h e 120h na diluição de 1:8.

Na figura 5 estão representados, graficamente, os resultados comparativos da resposta correspondente à utilização dos meios condicionados na diluição de 1:8 para cada um dos materiais às 24h, 72h e 120h.



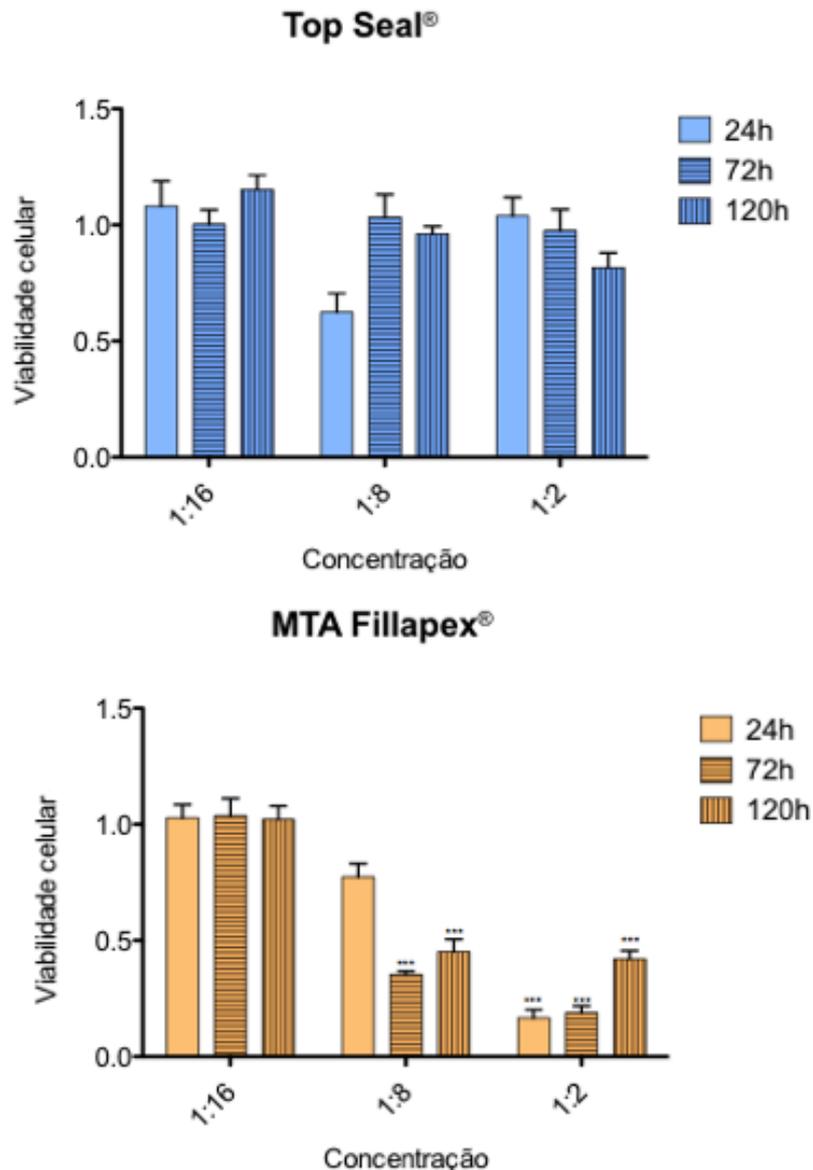
**Figura 5:** Atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento com meio condicionado de TopSeal® e MTA Fillapex® na diluição de 1:8 às 24, 72 e 120 horas. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, \*\* e \*\*\* sendo que indicam, respetivamente, um  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

Na diluição de 1:8 não há alteração da atividade metabólica para os dois materiais às 24h.

Observaram-se diferenças significativas entre o tratamento com MTA Fillapex® e o tratamento com Top Seal®, tanto para as 72h como para as 120h ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respetivamente). Enquanto para o Top Seal® se verifica uma diminuição da atividade metabólica com o tempo, com o MTA Fillapex® é verificado o seu aumento.

### Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular dos materiais utilizados em culturas celulares de fibroblastos humanos realizou-se o ensaio do SRB. Para tal foram utilizados os meios condicionados e respectivas diluições determinadas com base nos resultados preliminares de avaliação da atividade metabólica pelo ensaio do MTT. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. Na figura 6 está representada graficamente a resposta da utilização dos meios condicionados e respectivas diluições para cada um dos materiais às 24h, 72h e 120h.

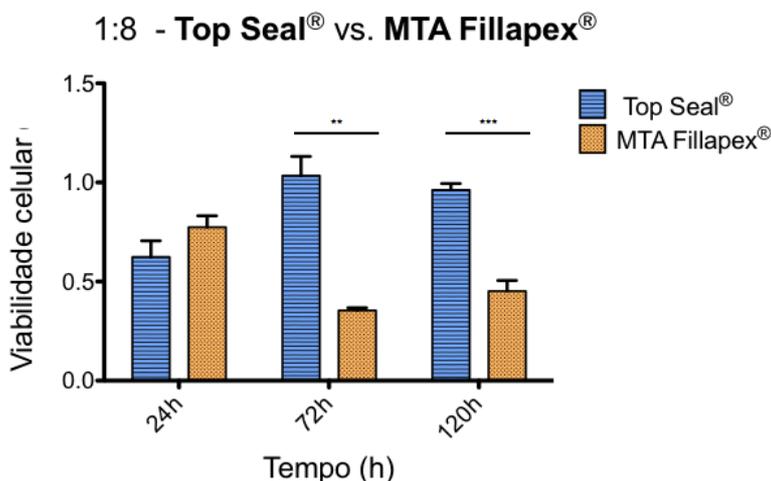


**Figura 6:** Viabilidade das células sujeitas ao tratamento com várias diluições de meios condicionados de TopSeal® e MTA Fillapex® às 24, 72 e 120 horas. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, \*\* e \*\*\* sendo que indicam, respetivamente, um  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

Para o Top Seal® não são verificadas alterações na viabilidade celular. Observa-se uma tendência para diminuição da viabilidade ao longo do tempo, no entanto, não se observaram diferenças significativas em relação ao controle.

Para o MTA Fillapex® verifica-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração dos meios condicionados. Para a diluição de 1:16 não há diferenças em relação ao controle. Nas diluições de 1:8 e 1:2 verifica-se uma diminuição da viabilidade às 24h, para  $0,77 \pm 0,06$  na diluição de 1:8 e para  $0,17 \pm 0,04$  na diluição de 1:2, ambas com diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Às 72h foram verificados valores de  $0,35 \pm 0,01$  na diluição de 1:8 e de  $0,19 \pm 0,03$  na diluição de 1:2, ambos com diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Verificou-se uma ligeira recuperação às 120h ( $0,045 \pm 0,05$  na diluição de 1:8 e  $0,42 \pm 0,03$  na diluição de 1:2), com valores significativos em ambas as diluições ( $p < 0,001$ ).

Na figura 7 estão representados, graficamente, os resultados comparativos da viabilidade correspondente à utilização dos meios condicionados na diluição de 1:8 para cada um dos materiais às 24h, 72h e 120h.

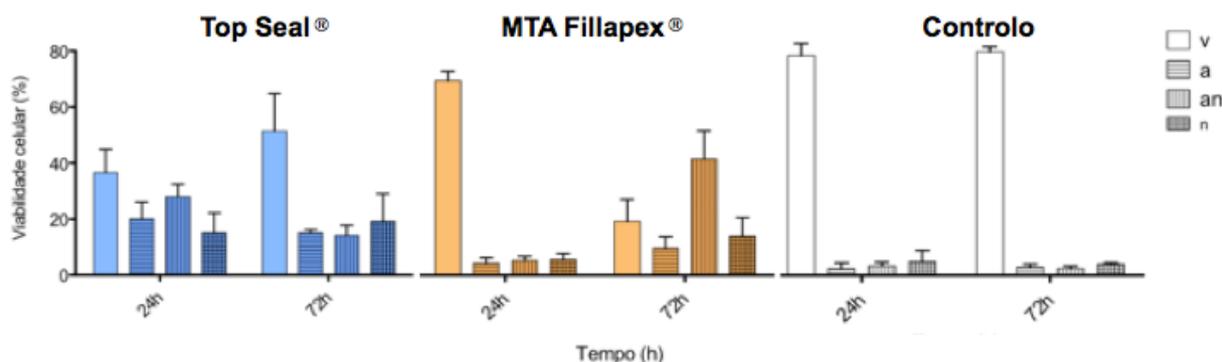


**Figura 7:** Viabilidade das células sujeitas ao tratamento com meio condicionado de TopSeal® e MTA Fillapex® na diluição de 1:8 às 24, 72 e 120 horas. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, \*\* e \*\*\* sendo que indicam, respetivamente, um  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

Às 24h foi verificada uma diminuição da viabilidade celular para ambos os materiais. No entanto, após 72 e 120h de incubação observaram-se diferenças significativas no tratamento com estes materiais, sendo que a viabilidade com o MTA Fillapex® é significativamente inferior à do Top Seal® ( $p < 0,01$  para as 72h e  $p < 0,001$  para nas 120h).

### Avaliação dos tipos de morte celular

A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com AnV-FITC e IP. Esta avaliação realizou-se em culturas celulares de fibroblastos humanos e foi utilizado o meio condicionado na diluição de 1:8.



**Figura 8:** Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a dupla marcação AnV/IP. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose, para cada uma das condições analisadas. **V:** células vivas; **A:** células em apoptose; **NA:** células em apoptose tardia/necrose; **N:** células em necrose. Valores correspondem a apenas dois ensaios preliminares portanto não foi realizada análise estatística dos mesmos.

Os resultados obtidos com este ensaio vão de encontro, de forma geral, aos resultados obtidos com os ensaios anteriores. Este ensaio, para além de permitir avaliar a percentagem de células vivas permite perceber qual o tipo de morte celular preferencial, se por apoptose, por necrose ou por apoptose tardia/necrose.

O MTA Fillapex® mostrou ser o material menos citotóxico às 24h apresentando valores de viabilidade bastante superiores aos do Top Seal® ( $82 \pm 4,06\%$  e  $36,6 \pm 8,29\%$ , respetivamente). Quanto ao tipo de morte celular provocada pelo Top Seal® observou-se uma população de células em apoptose tardia/necrose de  $28 \pm 4,47\%$ , em apoptose de  $20,2 \pm 5,98\%$  e em necrose de  $15,2 \pm 6,98\%$ . Para o MTA Fillapex® observou-se  $6,6 \pm 2,51\%$  células em necrose,  $6,2 \pm 1,79\%$  em apoptose tardia/necrose e  $5,2 \pm 2,17\%$  em apoptose.

Às 72h verifica-se uma alteração dos resultados, com o Top Seal® a apresentar valores de viabilidade superiores ao MTA Fillapex® ( $51,4 \pm 13,4\%$  e  $22,8 \pm 9,23\%$ , respetivamente). No que diz respeito à morte celular, verifica-se que enquanto para o Top Seal® a maior percentagem corresponde a necrose ( $19,2 \pm 9,83\%$ ), ocorrendo também apoptose ( $15,2 \pm 1,1\%$ ) e apoptose tardia/necrose ( $14,2 \pm 3,56\%$ ), para o MTA Fillapex® verifica-se uma maior percentagem de morte celular devido a apoptose tardia/necrose ( $49 \pm 11,9\%$ ). No tratamento com MTA Fillapex® também se verifica morte celular devido a necrose ( $16,6 \pm 7,83\%$ ) e a apoptose ( $11,6 \pm 4,72\%$ ).

## DISCUSSÃO

Durante e após a obturação dos canais radiculares, o cimento endodôntico entra em contato com os tecidos periapicais, logo é importante escolher um cimento biocompatível, com baixo potencial citotóxico.<sup>15, 36, 39, 40</sup> As propriedades do cimento endodôntico ideal incluem bom selamento, boa radiopacidade, facilidade na manipulação, boa resistência, estabilidade dimensional, bom escoamento e baixa solubilidade.<sup>6, 12, 15-21, 34</sup> Com a introdução de novos cimentos endodônticos no mercado é necessário testar as suas características e compará-las com materiais já regularmente usados e cujos efeitos já foram testados.<sup>38-40</sup> Contudo, tais testes devem cumprir padrões internacionais. No presente estudo foram seguidas normas da *International Organization for Standardization (ISO)*, maior organização mundial de padronização.<sup>17</sup> A avaliação da citotoxicidade foi elaborada de acordo as diretivas da norma ISO 10993-5.

O objetivo deste estudo consistiu na avaliação e comparação da citotoxicidade dos cimentos endodônticos Top Seal® e o MTA Fillapex® em fibroblastos humanos (HFF1), pelo estudo da atividade metabólica, da viabilidade celular e tipos de morte celular.

A citotoxicidade consiste em apenas um dos aspetos da biocompatibilidade, logo os seus testes *de per se* não caracterizam um material como biocompatível ou não.<sup>18</sup> Neste trabalho foi realizado o estudo da atividade metabólica pelo ensaio de MTT, que consiste num ensaio colorimétrico baseado na capacidade de células metabolicamente activas reduzirem, no meio intracelular, o sal solúvel de tetrazólio dando origem a cristais de *formazan*. O estudo da viabilidade celular foi realizado pelo ensaio do SRB (sulforodamina B), corante aniónico que se vai ligar às proteínas electrostaticamente e por fim foi realizado o estudo dos tipos de morte celular pelo ensaio de citometria, técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido.

Segundo a American Dental Association (1982) os testes de citotoxicidade com recurso a células são métodos aceites para testar a biocompatibilidade dos materiais dentários. Diferentes tipos de células podem ser utilizados para testes *in vitro*, sendo que estas podem ser provenientes de linhas imortalizadas ou de linhas primárias. As linhas celulares já estabelecidas oferecem a vantagem de melhorar a reprodutibilidade dos resultados e serem recomendadas pela ISO para uma avaliação primária da citotoxicidade. Os fibroblastos são o tipo celular predominante no tecido do ligamento periodontal, no qual desempenham um papel fundamental na sua renovação.<sup>44</sup> São também as células mais usadas para o estabelecimento de linhas celulares imortalizadas e, portanto, regularmente usadas em estudos de citotoxicidade.

É importante referir que os resultados da citotoxicidade obtidos para um mesmo ensaio e mesmo material podem variar devido a diferentes condições experimentais: utilização de diferentes linhas celulares, técnica utilizada, concentração dos extratos, preparação do material, tempo de presa (utilização do material com ou sem presa completa) e tempo de exposição ao meio de cultura celular.

Mesmo quando não atingem a região periapical diretamente, uma vez inseridos nos canais radiculares, os cimentos endodônticos libertam componentes solúveis que posteriormente sofrem diluição pelos fluidos tecidulares enquanto se difundem para os tecidos circundantes, através dos túbulos

dentinários, canais laterais e acessórios ou pelas foramina. Foi neste processo que se baseou o uso de meios condicionados no presente estudo. Quanto ao facto de serem sujeitos a diluições seriadas, o mesmo permite a avaliação dos possíveis efeitos dose-resposta de forma a simular a crescente diluição que ocorre *in vivo*.<sup>20, 40</sup>

Apesar da relevância de ensaios de toxicidade *in vitro* nas condições clínicas ser frequentemente questionada, estes testes mostram que o risco biológico dos cimentos endodônticos é relativamente alto, uma vez que vários dos seus componentes apresentam potencial para indução de efeitos tóxicos nos tecidos, causando alterações nos tecidos periradiculares e uma possível resposta inflamatória.<sup>40</sup>

No entanto, apesar da irritação transitória que os cimentos possam causar nos tecidos periapicais, os Médicos Dentistas devem ponderar as possíveis vantagens e desvantagens de extrusão dos mesmos, uma vez que áreas não seladas em apical, ou seja em casos de sub-obturação, proporcionam nichos favoráveis aos microrganismos, iniciando ou perpetuando falhas no tratamento endodôntico.<sup>40, 45</sup>

O MTA foi desenvolvido para selar as superfícies dentárias internas e externas, ou seja, é um material utilizado para fins cirúrgicos e de reparação.<sup>20</sup> Tem-se vindo a verificar um crescente interesse no desenvolvimento de cimentos endodônticos à base de MTA, devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade.<sup>34</sup> Neste estudo foi avaliada a citotoxicidade do MTA Fillapex®, cimento endodôntico recentemente introduzido no mercado, que foi desenvolvido na tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento endodôntico com as propriedades biológicas do MTA.<sup>17</sup>

O outro material usado para comparar foi o cimento resinoso Top Seal®, uma vez que se trata de um cimento “gold standard”, à base de resinas epóxicas. Este grupo de cimentos apresenta várias vantagens como um boa adesão, rápida polimerização e baixa solubilidade, sendo por isso amplamente usado em estudos comparativos de novos cimentos.<sup>4, 18, 26, 34</sup>

Os resultados obtidos mostraram que ambos os cimentos induziram uma resposta citotóxica nas células HFF1, dependente da dose e tempo decorridos. Em todos os ensaios, para as diluições de 1:16 e 1:8, foi verificada uma citotoxicidade moderada inicial (24h) com o Top Seal® que diminuiu com o tempo, passando a não apresentar efeito citotóxico após 120h. Para as diluições mais concentradas, de 1:1 sobretudo, foram registados valores de citotoxicidade mais elevados, em que houve uma perda acentuada de atividade metabólica e viabilidade celular. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios, para este tipo de cimentos, em que também se observou valores de citotoxicidade altos inicialmente e nas concentrações mais elevadas.<sup>26</sup> Esta resposta deve-se à possível libertação de monómeros resinosos durante a tomada de presa e à mutagenicidade das resinas epóxicas, mais notória nas diluições mais baixas.<sup>26</sup>

O MTA Fillapex® apresentou, para todos os ensaios, valores significativamente superiores de citotoxicidade. A atividade metabólica foi severamente afetada a todos os tempos, para as diluições de 1:1, 1:2 e 1:4; permanecendo apenas em valores semelhantes ao controlo na maior diluição (1:16). Contrariamente ao verificado com o Top Seal®, com o MTA Fillapex® houve uma maior resposta citotóxica a partir das 72h, ou seja, este material pode induzir alterações celulares irreversíveis fazendo com que a

atividade metabólica e viabilidade celular diminuem até as 120h. Os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por *Silva et al* (2013) que testou a citotoxicidade e propriedades físico-químicas do novo cimento, MTA Fillapex® em fibroblastos de camundogo (Balb/c 3T3) e comparou com o AH Plus®. Neste estudo os autores concluíram que, apesar de apresentar boas propriedades físico-químicas que o tornam num bom cimento, o MTA Fillapex® provoca um efeito citotóxico muito severo. No estudo de *Silva et al* (2013) em que avaliou os efeitos citotóxicos a longo prazo de vários cimentos, nomeadamente AH Plus®, Epiphany®, Endomethasone N®, Endo REZ®, MTA Fillapex®, Pulp Canal Sealer EWT®, RokeoSeal® e Sealapex® em fibroblastos de camundogo (Balb/c 3T3), também foi o MTA Fillapex® que provocou maior resposta citotóxica, tendo-se mantido severa a moderadamente citotóxico durante todo o tempo de estudo. No entanto convém referir que neste trabalho os tempos de estudo diferiram bastante dos nossos, sendo que as respostas celulares foram analisadas às 0 horas e semanalmente até à 5ª semana. Também *Bin et al* (2012) já tinham realizado um estudo comparativo de citotoxicidade entre MTA Fillapex®, White MTA® e AH Plus®. Os resultados mostraram que o MTA Fillapex® levou a uma resposta citotóxica mais severa, seguida do White MTA® e, por fim, do AH Plus®.

Os ensaios do MTT e SRB dão alguma informação acerca da função mitocondrial e viabilidade celular, respetivamente, no entanto, não revelam as alterações que conduzem à ativação das vias de morte. Para tal avaliação recorreu-se à citometria de fluxo, através da dupla marcação com An-V/IP.

No caso do MTA Fillapex® às 24h verificou-se uma grande percentagem de células viáveis ( $82\pm 4,06\%$ ), ocorrendo morte por apoptose em  $5,2\pm 2,17\%$ , por necrose em  $6,6\pm 2,51\%$  e por apoptose tardia/necrose em  $6,2\pm 1,79\%$ . Às 72h, a percentagem de células vivas diminui para  $22,8\pm 9,23\%$ , verificando-se uma tendência de morte celular por apoptose tardia/necrose ( $49\pm 11,9\%$ ). Estudos prévios que avaliaram o efeito de resinas de salicilato numa linha celular de fibrossarcoma humano (HT-1080) mostraram uma taxa de 25% de morte celular por apoptose, após 24h de exposição. A análise histológica das células mostra também sinais de apoptose, tais como contração, presença de vacúolos e fragmentos de material genético no citoplasma. O mecanismo pelo qual a apoptose ocorre ainda permanece desconhecido, mas alguns estudos referem que tem uma relação de proporcionalidade direta com a concentração de salicilatos.<sup>26</sup> No entanto não podemos relacionar estes dados com o nosso estudo quanto ao tipo de morte celular, uma vez que estes apenas foram avaliados numa diluição (1:8). Podemos apenas concluir que estão consistentes com os nossos, no facto de termos verificado maiores níveis de citotoxicidade para as menores diluições.

Sabe-se que a exposição de células a agentes citotóxicos pode conduzir a necrose ou apoptose. Durante a necrose, verifica-se um colapso da membrana citoplasmática e as células sofrem lise. A apoptose é geralmente caracterizada por um colapso interno dos organelos, uma desintegração da membrana plasmática em corpos vesiculares apoptóticos e a destruição do material genético. A eliminação das células por apoptose não é detectada pelo sistema imunológico, enquanto a eliminação do conteúdo intracelular das células necróticas para o espaço extracelular origina uma resposta inflamatória. A apoptose consiste, essencialmente, num tipo de morte celular programada, não afetando as células vizinhas. Pode ocorrer um processo simultâneo de necrose e apoptose tardia na mesma célula, na qual se verifica uma dupla marcação pela anexina V e iodeto de propídeo nos ensaios de citometria de fluxo.<sup>46</sup>

Quanto ao Top Seal® às 24h apresenta baixa percentagem de células viáveis (36,6±8,29%), ocorrendo morte celular sobretudo por apoptose tardia/necrose (28±4,47%), seguida de apoptose (20,2±5,89%) e necrose (15,2±6,98%). Às 72h verifica-se uma recuperação, com uma percentagem de células viáveis superior à verificada às 24h (51,4±13,4%), sendo que a este tempo na maioria das células foi verificada morte celular por necrose (19,2±9,83%). Os resultados do ensaio de citometria vão de encontro, de forma geral, aos obtidos pelos ensaios de MTT e SRB, em que se verifica uma maior citotoxicidade inicial<sup>18, 26, 39</sup> e nas maiores concentrações, que se deve, possivelmente, à libertação de monómeros durante e nas primeiras horas após a tomada de presa.<sup>26, 39</sup>

O desenvolvimento de novos produtos a partir da associação de materiais que apresentam boas propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas nem sempre leva ao efeito sinérgico desejado. De acordo com os nossos resultados e com a literatura atual, as alterações de composição efetuadas que resultaram no novo cimento MTA Fillapex® não foram suficientes para atingir as características pretendidas em relação à solubilidade, tempo de presa e citotoxicidade.<sup>17, 18</sup> Convém salientar a importância de se estudar as interações entre os componentes de um novo produto, de modo a obter uma formulação que assegure a sua qualidade para uso clínico. Ao contrário de outros cimentos endodônticos à base de MTA, o MTA Fillapex® consiste num cimento com composição bastante alterada, a fim de melhorar as suas propriedades físico-químicas, o que, muito provavelmente, influencia as suas propriedades biológicas. A maior citotoxicidade deste novo cimento pode, provavelmente, ser explicada pela presença: de resina de salicilato, resina diluente e resina natural, introduzidas a fim de melhorar o escoamento e tempo de trabalho; de óxido de bismuto, colocado em maior quantidade de modo a aumentar a radiopacidade e pela presença de outros pigmentos.<sup>17, 18, 20, 26, 34</sup>

*Coomaraswamy et al (2007)* estudaram a influência do óxido de bismuto na resistência de cimentos à base de Cimento de Portland. Verificaram que este componente, presente na fórmula do MTA Fillapex® reduz a estabilidade do cimento devido ao aparecimento de fissuras e a um aumento de porosidade, o que leva a um aumento da sua solubilidade e diminuição da resistência à compressão.<sup>47</sup>

*Camilleri et al (2008)* avaliou o tempo de presa, força de resistência, pH e absorção de água do Cimento de Portland (CP) branco, CP branco sem gesso e CP branco com óxido de bismuto (25%). Os resultados mostraram que a adição de óxido de bismuto levou a um aumento do tempo de presa, diminuição da força de compressão, diminuição da força de resistência e a um aumento da absorção de água.<sup>48</sup>

É importante referir que o cimento MTA Fillapex® nunca tomou presa completa, o que, possivelmente, teve grande influência nos resultados obtidos, levando a uma maior libertação de compostos tóxicos por longos períodos. Este facto já foi referido por *Salles et al (2012)* no seu estudo sobre biocompatibilidade e bioatividade dos cimentos MTA Fillapex®, ZOE® e Epiphany®, em que o MTA Fillapex® apenas tomou presa após 7 dias. Neste estudo foi avaliada a atividade metabólica pelo ensaio MTT. Para o MTA Fillapex® foi verificada uma diminuição da atividade metabólica até ao 7º dia, após o qual há uma recuperação, permitindo concluir que após tomar presa a citotoxicidade deste cimento diminui.

O cimento MTA Fillapex® apresenta um valor de pH alto<sup>17</sup>, o que indica que tem alta capacidade de libertar iões hidróxido. Valores altos de pH vão ativar a fosfatase alcalina, presente nos tecidos e envolvida

no processo de mineralização e que requer um pH entre 8,6 e 10,3. O pH alcalino também pode neutralizar os ácidos secretados pelos osteoclastos, prevenindo a destruição de tecido mineralizado. Esta alcalinidade também pode constituir uma desvantagem, na medida em que pode levar a altos valores de citotoxicidade. Contudo, situações de citotoxicidade inicial podem ser consideradas benéficas, na medida em que valores altos de pH vão ter um efeito destrutivo nas membranas bacterianas e estruturas proteicas. Uma vez que os microrganismos podem permanecer nas ramificações do sistema de canais após preparação químico-mecânica e obturação, ao apresentar atividade antimicrobiana os cimentos podem agir contra tais microrganismos, reduzindo o seu número e promovendo melhores probabilidades de bom prognóstico do tratamento e maior sucesso.<sup>45</sup>

## CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível tirar as seguintes conclusões:

A citotoxicidade dos materiais é dependente da diluição do meio condicionado e do tempo de exposição.

O MTA Fillapex® foi associado a uma viabilidade celular significativamente menor, em todo o estudo. A sua citotoxicidade aumentou com a concentração do meio condicionado e com o tempo de exposição, apresentando valores elevados de solubilidade e longo tempo de presa. Para concentrações mais elevadas reduz severamente a atividade metabólica e após 72h apresenta uma percentagem de células viáveis muito reduzida.

O Top Seal® mostrou ser um material mais biocompatível. Apresentou níveis baixos de citotoxicidade, excepto na concentração mais elevada (1:1). Este material tende a aumentar a biocompatibilidade ao longo do tempo, com recuperação dos danos iniciais.

Os resultados do nosso trabalho devem ser considerados como uma primeira abordagem para a caracterização de novos materiais a utilizar na clínica. Apesar de, como referido na literatura, o MTA Fillapex® apresentar boas propriedades físico-químicas, são necessários mais estudos que avaliem as suas propriedades biológicas de modo a confirmar a sua segurança para uso na terapêutica endodôntica.

## Bibliografia

1. Willershausen I CA, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & Face Medicine* 2011;7-15.
2. Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK, et al. A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restor Dent Endod* 2013;38(4):204-9.
3. Tyagi S, Tyagi P, Mishra P. Evolution of root canal sealers: An insight story. *European Journal of General Dentistry* 2013;2(3):199.
4. Ferreira MM, Abrantes M, Ferreira H, Carrilho EV, Botelho MF. Comparison of the apical seal on filled root canals with Topseal vs MTA Fillapex sealers: A quantitative scintigraphic analysis. *Open Journal of Stomatology* 2013;03(02):128-32.
5. Thakur SE, Jonathan, Paulaiian, Benin. Evaluation of mineral trioxide aggregate as root canal sealer: A clinical study. *Journal of Conservative Dentistry* 2013.
6. Vitti RP, Prati C, Silva EJ, et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod* 2013;39(7): 915-8.
7. Naik RP, Pushpa. Can MTA be: Miracle trioxide aggregate? *Journal of Indian Society of Periodontology* 2014;18(1):5-8.
8. Zmener OL, R. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *Journal of endodontics* 2012;38(9):1233-38.
9. Borges ÁHD, Maura Cristiane Gonçalves. Physicochemical Properties and Surfaces Morphologies Evaluation of MTA Fillapex and AH Plus. *The Scientific World Journal* 2014.
10. Vitti RP, C.; Sinhoreti, Mário. Chemical-physical properties of experimental root canal sealers based on butyl ethylene glycol disalicylate and MTA. *Dental Materials* 2013;29:1287-94.
11. Gomes-Filho JE, Moreira JV, Watanabe S, et al. Seability of MTA abd calcium hydroxide-containing sealers. *J Appl Oral Sci* 2012;20(3):347-51.
12. Vidotto A CR, Zeferino E, Rocha D, Martin A, Bueno C. Comparioson of MTA Fillapex radiopacity with five root canal sealers. *RSBO* 2011;8(4):404-9.
13. Kim RJYS, Joo Hee. Cytotoxicity of a novel mineral trioxide aggregated-based root canal sealer. *Dental Materials Journal* 2014;33(3):313-18.
14. Santos CS. Estudo in vitro da biocompatibilidade dos cimentos de obturação endodônticos. [Universidade do Porto; 2012.
15. Cohen S. *Caminhos da Polpa*. 9ª ed: Elsevier; 2007.
16. Faraoni G, Finger MS, Masson MC, Victorino FR. Comparative assessment of flow and setting time of the MTA Fillapex sealer. *RFO* 2013;18(2):180-4.
17. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, et al. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod* 2013;39(2):274-7.
18. Guven EP YM, Kayahan MB, Sunay H, Sahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci* 2013;21(4):351-7.
19. Rawtiya M VK, Singh S, Munuga S, Khan S. MTA-based root canal sealers. *Journal of Orofacial Research* 2013;3(1):16-21.
20. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, 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(2): 111-6.
21. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod* 2009;35(4): 475-80.
22. Kim YK, Grandini S, Ames JM, et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod* 2010;36(3):383-99.
23. Darvell BW, Wu RC. "MTA"-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011;27(5):407-22.
24. Sonmez IS OA, Sonmez D, Almaz ME. In vitro evaluation of apical microleakage of a new MTA-based sealer. *European Archives of Paediatric Dentistry* 2012.
25. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008;24(2):149-64.

26. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012;38(4):495-500.
27. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010;36(1):16-27.
28. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36(2):190-202.
29. Kuga MC FG, Weckwerth PH, Duarte MAH, Campos EA, Só MVR, Viola KS. Evaluation of the pH, calcium release and antibacterial activity of MTA Fillapex. *Revista de Odontologia da Unesp* 2013;42(5):330-35.
30. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100(7):1773-81.
31. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010;36(3):400-13.
32. Borges RPS-N, M. D. . Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal* 2011;45:419-28.
33. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dent Traumatol* 2012;28(6):452-6.
34. Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 2012;38(7):971-6.
35. Carpenter MS, Stephanie. Regaining Apical Patency after Obturation with Guta-percha and a Sealer Containing Mineral Trioxide Aggregate. *JOE* 2014;40(4).
36. Marques NCT, Lourenço Neto N, Fernandes AP, et al. Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex and Portland cement. *Brazilian Dental Journal* 2013;24(1):10-14.
37. Ashraf H MN, Mozayeni MA, Dianat O, Mahjour F, Yadegari Z. Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dental Research Journal* 2012;9(5):549-53.
38. Scelza ML, A; Silva, L. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal* 2012;45:12-18.
39. Cotti E, Petreucic V, Re D, Simbula G. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an *in vitro* study. *J Endod* 2014;40(1):124-8.
40. Silva EJM, Santos CC, Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci* 2013;21(1):43-7.
41. Martins VJM, Lins RX, Berlinck TCÁ, Fidel RAS. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. *Brazilian Dental Journal* 2013;24(1):15-20.
42. Moura CC ON, Borges CR, Souza MA, Biffi JC. Cytotoxic response of two cell lines exposed *in vitro* to four endodontic sealers. *Braz J Oral Sci* 2012;11(2):135-40.
43. Freshney RI. Culture of animal cells - a manual of basic technique. In: Wiley, editor. fifth ed.
44. Weijden F EJ, Sanz M, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5ª ed ed; 2008.
45. Siqueira J. Endodontic failure Siqueira. *IEJ* 2001;34:1-10.
46. Moghaddame-Jafari S MM, Botero TM, McDonald NJ. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. *Journal of Endodontics* 2005;31(5):387-91.
47. Coomaraswamy KL, PJ; Hofmann, MP. Effect of bismuth oxide radio-opacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-base (MTA-like) system. *Journal of Endodontics* 2007;33(3):295-98.
48. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland Cement for endodontic use. *International Endodontic Journal* 2008;41(2):151-57.