

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DÉBORA FERREIRA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS ENDODÔNTICOS NO
TRATAMENTO DE PERFURAÇÕES RADICULARES

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Barreto Bezerra

BRASÍLIA
2010

DÉBORA FERREIRA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS ENDODÔNTICOS NO
TRATAMENTO DE PERFURAÇÕES RADICULARES

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 19 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Cristina Barreto Bezerra (presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Estrela
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Edson Dias Costa Júnior
Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Soraya Coelho Leal
Universidade de Brasília

Ao Professor Sérgio Valmor Barbosa

“É tão estranho os bons morrem jovens...
Assim parece ser, quando me lembro de você
Que acabou indo embora...
Cedo demais (...)
Eu continuo aqui, o meu trabalho e meus amigos
E me lembro de você em dias assim:
Dia de chuva, Dia de sol
E o que sinto não sei dizer
Vai com os anjos, vai em paz
Era assim todo dia de tarde, a descoberta da amizade
Até a próxima vez!
É tão estranho, os bons morrem antes
Me lembro de você e de tanta gente que se foi cedo demais
E cedo demais (...)
Lembro das tardes que passamos juntos,
Não é sempre, mas eu sei que você está bem agora
Só que neste ano o verão acabou
Cedo demais.”
(Legião Urbana – Os bons morrem jovens)

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai de eterna bondade e misericórdia. Obrigada pela dádiva de mais uma vez estar neste plano, podendo aprender com meus semelhantes às virtudes proclamadas a mais de dois mil anos. Obrigada por cada amanhecer! Obrigada por cada anoitecer!

Ao meu marido Alexandre, você foi uma luz consoladora nos momentos mais difíceis desta etapa. Obrigada pela compreensão dos momentos de ausência. Obrigada por cada dia que passamos juntos.

Aos meus pais, Wagner e Creuza, aos meus irmãos, Eric, Tatiana e Wagner Júnior, por todo o sacrifício e todo amor (valeu Júnior todas as aulas de informática!) para que eu pudesse alcançar essa vitória. Aos meus sogros, Milton e Sirlei, pelo carinho e apoio.

Aos meus enteados, Guilherme e Beatriz, por me mostrarem que existem muito mais desafios e alegrias em cada conquista.

Aos meus amigos Gislaine Ribeiro, Marcelo Fachini e Edivaldo Teles por nunca me deixarem desanimar, principalmente nos momentos que pareciam que tudo ia dar errado. Aos amigos Rosana Wos da Rosa, Ivânio Luz, Alfredo Carlos Honorato Reis e Marina Passebon por todos os ótimos momentos juntos e por não me fazerem esquecer que a vida é muito mais do que se imagina.

Às amigas Alessandra Gama, Adriana Luz e Gertrude Craesmeyer pela amizade e pelos bons momentos vividos.

Ao professor Ricardo Bentes que gentilmente permitiu que eu realizasse a pesquisa no laboratório de morfologia. Ao mesmo tempo em que demonstrou que vale a pena fazer pesquisa.

Às colegas Maitê C. Mijan e Larissa Naves D. Melo que de maneira doce me auxiliaram no início da pesquisa e Nathália Vieira Veloso pelo valioso empréstimo. Obrigada por terem me apresentado à Graziela Joanitti, Jaqueline Rodrigues e todos os colegas do laboratório de Morfologia e Morfogênese que seguiram os seus passos e foram de extraordinária ajuda, pelo companheirismo, pela amizade e pelas discussões científicas.

Às amigas Andréia Cunha e Andréa Oliveira pelo apoio, pelo incentivo e fundamentalmente, pela amizade. Aos colegas do Hospital Universitário que sempre deram apoio e o incentivo para não desistir diante dos obstáculos.

Ao programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde e demais funcionários da Faculdade e Laboratórios de Bioquímica, de Chagas, de Microscopia Eletrônica obrigada pela oportunidade.

À professora Marie Togashie pelas valiosas orientações no projeto da pesquisa.

Ao Professor Eduardo Freitas da Silva não só pela estatística, mas principalmente pela amizade.

À professora Ana Cristina Barreto Bezerra por ter-me “adotado” num momento tão difícil. Muito mais do que a orientação deste trabalho, obrigada por ter me mostrado, com gestos, o significado do título. O seu carinho aliado à sua sabedoria, sem nunca perder a humildade de reconhecer que ainda há muito por aprender foram fundamentais para compreensão daquilo que tanto almejava. Não um título, mas o início de um longo caminho.

Ode “À Alegria”

(Schiller, 1786)

*Amigos, basta desses cantos!
Entoemos um outro e mais agradecido:
O cântico do júbilo!*

*Alegria, brilhante centelha da divindade,
Filha de Elísio.
Adentramos, semblantes ardentes,
Teu glorioso santuário!
Tua força mágica irmana,
O que o mundo separou;
Todos os homens tornam-se irmãos
Onde a asa tua gentil pousou.*

*Quem atingiu o supremo bem,
De ter por amigo um amigo,
Quem obteve suave esposa,
Esteja conosco no áureo júbilo!
Sim, quem ainda uma só alma
Pôde no mundo sua chamar!
Quem não pôde conduza em pranto
Para longe daqui seu triste caminhar*

*Todos os seres bebem da alegria
No seio da natureza;
Bons e maus
Vão por seus floridos caminhos.
Prodigaliza-nos com beijos e vinho,
Amigos fiéis até a morte;
Até o verme pode sentir prazer,
E o querubim permanece diante de Deus!*

*Alegres, como corpos celestiais voam
Sobre o plano rubro dos céus,
Ide, irmãos, a exultar,
Alegres, como heróis rumo à vitória.*

*Multidões, eu vos abraço.
Esse beijo envio ao mundo inteiro!
Irmãos! Acima desse dossel estrelado
Deve reinar um terno Pai.
Prostrais-vos, multidões?
Sentes o teu Criador, mundo?
Buscai-o então acima dos astros!
Além das estrelas está sua morada.*

(tradução: Mário Willmersdorf Jr.)

RESUMO

Perfurações radiculares podem ser seladas com auxílio de materiais endodônticos, que ficam em contato direto com as células do ligamento periodontal, podendo causar danos que retardem ou impeçam o processo de reparo. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a citocompatibilidade dos extratos dos materiais endodônticos (Endofill, Sealer 26, cimento de Portland branco e Cimento de óxidos bioativos), recém espatulados e após 24 horas de presa, em contato com células do ligamento periodontal humano. Foram utilizados como parâmetros de análise a capacidade de proliferação, o potencial transmembrânico mitocondrial, as alterações morfológicas, o potencial genotóxico e as alterações no ciclo celular. As células do ligamento periodontal foram obtidas a partir da extração de quatro terceiros molares e cultivadas em laboratório, conforme protocolos de cultura de células. As análises dos efeitos foram realizadas por meio do teste MTT de viabilidade celular, análise microscópica e a citometria de fluxo utilizando como fluorocromos rodamina 123 e iodeto de propídio. O pH foi avaliado pela medição imediata do meio de cultura com extrato do cimento endodôntico com auxílio de pHmetro calibrado. Os resultados obtidos, após análise estatística (ANOVA a três fatores, com nível de significância $p < 0,05$), revelaram que a composição dos materiais é o fator mais influente nas alterações celulares. Todos os materiais demonstraram algum grau de toxicidade para as células do ligamento periodontal dependendo da análise realizada. Somente o Endofill demonstrou toxicidade em todos os testes. Cimento de óxidos bioativos e o cimento de Portland branco não causaram alterações no potencial transmembrânico mitocondrial. Sealer 26, Sealer α e Cimento de Portland branco aumentaram o pH do meio e os dois primeiros também provocaram alterações morfológicas. Cimento de óxidos bioativos foi o que causou os menores danos ao DNA celular e, portanto, as menores alterações em ciclo celular. A citotoxicidade tende a diminuir à medida que a reação presa se completa. Apesar dos resultados, faz-se necessário continuar as pesquisas, com organismos vivos, para predizer e estabelecer a compatibilidade dos materiais.

Palavras-chave: viabilidade celular, genotoxicidade, endodontia, pH, alterações morfologia, mitocôndria, ligamento periodontal

ABSTRACT

Root perforations can be sealed with the aid of endodontic materials, which are in direct contact with the periodontal ligament cells, may cause damage to slow or prevent the repair process. Our objectives were to evaluate the cytocompatibility of the extracts of endodontic materials (Endofill, Sealer 26, white Portland cement and bioactive oxides-based sealer), after contact for 24 hours with human periodontal ligament cells. The cell viability, the mitochondrial transmembrane potential, the morphological changes, the genotoxic potential and changes in the cell cycle were evaluated by MTT assay and flow cytometry. The periodontal ligament cells were obtained from the extraction of four third molars and cultured in the laboratory by cell culture protocols. The pH was measured at the material extract at varying time intervals with calibrated pHmeter. The results, after statistical analysis (ANOVA with three factor interaction, $p < 0.05$), revealed that the composition of materials is the most influential factor in the cellular changes. All materials showed some degree of toxicity to the cells of periodontal ligament depending on the analysis. Only Endofill demonstrated toxicity in all tests. Bioactive oxides-based sealer and white Portland cement did not cause changes in mitochondrial transmembrane potential. Sealer 26, Sealer α and white Portland cement increased the pH of the medium and the first and second also caused morphological changes. Bioactive oxide-based sealer was what caused the least damage to cellular DNA and thus the smallest changes in the cell cycle. The cytotoxicity tends to decrease as the set reaction is complete. Despite the results, it is necessary to continue research with living organisms to predict and establish the compatibility of materials

Keywords: Endodontics, genotoxicity, cell viability, pH, cell morphological, periodontal ligament, mitochondria

SUMÁRIO

Introdução.....	10
Referências.....	13
Objetivos.....	15
Artigo 1 Avaliação da viabilidade celular na presença de materiais endodônticos.....	16
1.1 Resumo.....	17
1.2 Abstract.....	17
1.3 Introdução.....	17
1.4 Materiais e Métodos.....	19
1.4.1 Cultura primária de células do ligamento periodontal (PDL).....	19
1.4.2 Preparo das amostras.....	19
1.4.3 Teste MTT.....	21
1.4.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	21
1.4.5 Análise estatística.....	21
1.5 Resultados.....	22
1.5.1 Teste MTT.....	22
1.5.2 Avaliação do $\Delta\Psi_m$	24
1.6 Discussão.....	24
1.7 Conclusões.....	28
1.8 Referências.....	28
Artigo 2: Avaliação das alterações morfológicas das células de ligamento periodontal humano após contato com materiais endodônticos.....	32
2.1 Resumo.....	33
2.2 Abstract.....	33
2.3 Introdução.....	34
2.4 Materiais e Métodos.....	35
2.4.1 Cultura primária de células do ligamento periodontal (PDL).....	35
2.4.2 Preparo das amostras.....	36
2.4.3 Determinação do volume e da granulosidade celular por citometria de fluxo.....	37
2.4.4 Análise morfológica.....	37
2.4.5 Análise do pH do extrato.....	38
2.5 Resultados.....	38
2.5.1 Análise volumétrica.....	38
2.5.2 Análise morfológica.....	41
2.5.3 Análise do pH.....	43
2.6 Discussão.....	45
2.7 Conclusões.....	47
2.8 Referências.....	47
Artigo 3: Avaliação da genotoxicidade de materiais endodônticos com células de ligamento periodontal humano.....	49
3.1 Resumo.....	50
3.2 Abstract.....	50
3.3 Introdução.....	51
3.4 Materiais e Métodos.....	53
3.4.1 Cultura primária de células do ligamento periodontal (PDL).....	53
3.4.2 Preparo de amostras.....	53
3.4.3 Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo.....	55
3.5 Resultados.....	55
3.5.1 Fragmentação de DNA.....	55
3.5.2 Ciclo celular.....	58
3.6 Discussão.....	63

Conclusões.....	64
Referências.....	65
Discussão geral.....	68
Perspectivas futuras.....	74
Conclusões finais.....	75
Referências.....	76
Anexo 1 Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal ligament fibroblasts.....	80
Anexo 2 Carta de aceite para o artigo “Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal ligament fibroblasts”.....	96
Anexo 3 Termo de aprovação do Comitê de Ética.....	98
Anexo 4 Descrição detalhada dos testes de citotoxicidade e de genotoxicidade.....	100
Anexo 5 Morphological cell changes at human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials.....	104
Anexo 6 Genotoxicity of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro.....	122

Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico está relacionado com fatores biológicos de ausência de processos infecciosos ou inflamatórios crônicos. Dentre as principais causas de insucesso observam-se as obturações incompletas e as perfurações radiculares.

As perfurações radiculares são aberturas artificiais criadas na parede da raiz causadas por iatrogenias, cárie ou reabsorções patológicas e que resultam em comunicação entre o espaço pulpar e as estruturas periodontais (1, 2).

Como conseqüência, as perfurações geram uma resposta inflamatória no ligamento periodontal e no osso alveolar, o que reduz o prognóstico de sucesso (3). Aquelas presentes na furca e no terço cervical da raiz apresentam pior prognóstico, pois o processo inflamatório provoca reabsorção e destruição óssea, destruição das fibras do ligamento periodontal, proliferação do epitélio gengival e desenvolvimento de bolsa periodontal (1-7).

Os principais fatores relacionados com o prognóstico em longo prazo do reparo das perfurações no terço cervical e soalho da câmara pulpar são:

- a) Localização do defeito em relação à crista óssea: perfurações próximas a margem óssea provocam perda óssea irreversível (8);
- b) Facilidade de acesso para reparação: Perfurações no soalho da câmara pulpar e no terço cervical são fáceis de serem trabalhadas. Aquelas localizadas nos terços médio e apical são seladas com o próprio material obturador de canais, necessitando às vezes de complementação cirúrgica (9);
- c) Tamanho do defeito: As pequenas perfurações são mais fáceis de serem trabalhadas e evitam o extravasamento de material ao periodonto (10);
- d) Presença de comunicação do sulco gengival com o defeito: infiltração bacteriana resulta em inflamação crônica (3);

- e) Tempo decorrido entre a perfuração e o selamento: o grau de inflamação do tecido periodontal torna-se cada vez mais severo, à medida que o tempo passa entre a perfuração e o seu selamento (9);
- f) Fatores subjetivos: como competência profissional e higiene oral do paciente;
- g) Capacidade de selamento do material restaurador: a infiltração dos materiais restauradores permite o estabelecimento de infecção persistente (3).

Um selamento hermético pode ser alcançado com material não reabsorvível, que não sofra alterações das propriedades físicas na presença de hemorragia, que seja radiopaco e bacteriostático (2, 4, 7, 11).

O prognóstico do reparo pode ser afetado pela biocompatibilidade do material (2). Biomateriais são definidos como aplicação da ciência dos materiais à Biologia. É o estudo de elementos estruturais naturais ou artificiais no corpo baseado na relação entre propriedades estruturais/físico-químicas/mecânicas (12).

A bioatividade de um material sugere uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação da ligação entre o tecido e o material (13). Desta forma, a combinação de bioatividade e propriedades mecânicas específicas permitem a produção de materiais com propriedades seletivas para problemas biomédicos específicos (14).

A manutenção do aparato de suporte do dente deve ser o maior objetivo nos tratamentos reparadores (15). Dessa forma, o material utilizado deve permitir a inserção das fibras colágenas no próprio material, para restabelecer a função do ligamento periodontal. A liberação de componentes tóxicos ou inibitórios para a cementogênese ou a presença física do material no tecido periodontal podem agir como fatores de irritação e impedir o reparo.

Vários materiais já foram testados no reparo de perfurações como Cavit® (1), cimento à base de óxido de zinco-eugenol (9); hidróxido de cálcio (15), amálgama de prata (5, 16, 17), guta-percha (16), hidroxiapatita (18), ionômero de vidro (19, 20) e tricálcio-fosfato (15).

Atualmente, o material mais utilizado é o agregado mineral trióxido (MTA). Várias pesquisas têm demonstrado que o MTA é biocompatível (5, 21), apresenta maior capacidade de selamento (22) e é capaz de induzir a cementogênese (23).

Não obstante, possui o inconveniente de necessitar de mais sessões clínicas (24) aumentando o risco de contaminação entre as sessões. Ao ser manipulado, forma uma mistura arenosa difícil de ser mantida no lugar e difícil de ser compactada na cavidade (25), além de tender à desidratação o que acarreta numa perda de coesividade piorando a manipulação do material (26). Adiciona-se aos inconvenientes o custo do material, que por ser muito elevado, inviabiliza o seu uso na rede pública de saúde.

Foi desenvolvido na Universidade de Brasília um material formado por óxidos bioativos, como cálcio, fósforo e sílica com a finalidade de ser utilizado como material para reparo de perfurações radiculares e retro-obturador (27). Para garantir maior adesividade e resistência ao material, utiliza-se a resina epóxi com veículo (28, 29). O escoamento e os tempos de trabalho e de presa são semelhantes aos do Sealer 26, sendo que a maior vantagem é a estabilidade dimensional (27). O novo material será referido ao longo do trabalho como Sealer α .

A presença desses óxidos poderia estimular a adesão das fibras colágenas e a diferenciação das células do ligamento periodontal em células tipo-cementoblastos. Assim, seria possível alcançar o reparo da região perfurada e a reorganização da estrutura periodontal adjacente. Por ser formado pela mesma resina do cimento utilizado na obturação de canais, poder-se-ia obter uma maior resistência do material na região selada, uma vez que as propriedades físicas são semelhantes.

Frente a estas desvantagens do MTA faz-se necessário a pesquisa de novos materiais que diminuam o tempo e o custo do tratamento, que possuam propriedades físicas necessárias para manterem a área selada e que conservem ou superem a biocompatibilidade do atual.

Referências

1. Jew R, Weine F, Keene J, Smulson M. A histologic evaluation of periodontal tissue adjacent to root perforation filled with Cavit. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54:124-35.
2. Alhadainy HA. Root perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(3):368-74.
3. Seltzer S. Root canal failures. In: Seltzer S, editor. *Endodontology: biologic considerations in endodontic procedures*. 2 nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988. p. 439-70.
4. Lemon R. Nonsurgical repair of perforations defects. Internal matrix concept. *Dental Clinics of North America*. 1992;36(2):439-57.
5. Pitt Ford T, Torabinejad M, McKendry D, Hong C-I, Kariyawasam S. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 1995;79(6):756-62.
6. Torabinejad M, Lemon R. Acidentes de procedimentos. In: Walton R, Torabinejad M, editors. *Princípios e prática em Endodontia*. 2 ed ed. São Paulo: Santos; 1997. p. 306-23.
7. Bryan E, Woollard G, Mitchell W. Nonsurgical repair of furcal perforations: a literature review. *Gen Dent*. 1999;47(3):274-8.
8. Martin LR, Gilbert B, Dickerson A, II. Management of endodontic perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;54(6):668-77.
9. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. *Journal Dental Research*. 1970;49(2):332-9.
10. Fuss Z, Trope M. Root perforations: classification and treatment choices based on prognostic factors. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12:255-64.
11. Tai K-W, Chang Y-C. Cytotoxicity evaluation of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Endodontics*. 2000;26(7):395-7.
12. Smith DC. Biomaterials in dentistry. *J Dent Res*. 1975;54(Spec Issue B):B146-B52.
13. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487-510.
14. Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science*. 1984;226(9):630-6.
15. Himel VT, Brady J, Weir J, Jr. Evaluation of repair of mechanical perforations of pulp chamber floor using biodegradable tricalcium phosphate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1985;11(4):161-5.

16. Benenati F, Roane J, Biggs J, Simon J. Recall evaluation of iatrogenic root perforations repaired with amalgam and gutta-percha. *J Endod.* 1986;12(4):161-6.
17. Nakata T, Bae K, Baumgartner J. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using anaerobic bacterial leakage model. *J Endod.* 1998;24(3):184-6.
18. Holtgrave E-A. attachment of cementum on different hydroxylapatite ceramic (HCA) substrat in vivo. A light and electron microscopy study. *J Periodont Res.* 1991;26:511-8.
19. Chau J, Hutter J, Mork T, Nicoll B. An in vitro study of furcation perforation repair using calcium phosphate cement. *J Endod.* 1997;23(9):588-92.
20. Holland R, Souza V, Nery M, Otoboni J, Filho, Bernabé P, Dezan E, Jr. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or glass ionomer sealer. *J Endod.* 1999;25(11):728-30.
21. Holland R, Otoboni J, Filho, Souza V, Nery M, Bernabé P, Dezan E, Jr. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod.* 2001;27(4):281-4.
22. Torabinejad M, Higa R, McKendry D, Pitt Ford T. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod.* 1994;20(4):159-63.
23. Bernabé P, Gomes-Filho J, Rocha W, Nery M, Otoboni J, Filho, Dezan E, Jr. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. *Int Endod J.* 2007;40:758-65.
24. Hardy I, Liewehr F, Joyce A, Agee K, Pashley D. Sealing ability of one-up bond and MTA with and without a secondary seal as furcation repair materials. *J Endod.* 2004;30(9):658-61.
25. Kogan P, He J, Glickman G, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006;32(6):569-72.
26. Ber B, Halton J, Stewart G. Chemical modifications of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod.* 2007;33(10):1231-4.
27. Carneiro DF. Cimento endodôntico à base de biocerâmica. Avaliação das propriedades físicas [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2001.
28. Huang F-M, Chang Y-C. Prevention of epoxy resin-based root canal sealers-induced cyclooxygenase-2 expression and cytotoxicity of human osteoblastic cells by various antioxidants. *Biomaterials.* 2005;26:1849-55.
29. Lee K-W, Williams M, Camps J, Pashley D. Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. *Journal of Endodontics.* 2002;28:684-8.

Objetivos

Geral

Avaliar a toxicidade dos materiais endodônticos em contato com as células do ligamento periodontal humano.

Específicos

1. Avaliar a proliferação das células do ligamento periodontal após contato com extratos dos materiais endodônticos
2. Avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial após contato com extratos dos materiais endodônticos
3. Avaliar alterações morfológicas nas células do ligamento periodontal após o contato com extratos dos materiais endodônticos.
4. Avaliar o potencial genotóxico dos extratos dos materiais
5. Avaliar as alterações no ciclo celular causadas pelos extratos dos materiais endodônticos

Artigo 1

Avaliação da Viabilidade celular na presença de materiais endodônticos

Carneiro, D. F.^a; Bezerra, A. C. B^b^a Doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil^b Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

Título original

Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal
ligament fibroblast¹

Enviado para: Brazilian Oral Research

Aceito em: 05/04/2010².“Todas as flores do futuro
estão nas sementes de hoje.”

Provérbio Chinês

¹ Anexo 1² Anexo 2

1.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de células de ligamento periodontal humano após contato com materiais endodônticos: cimento de óxido de zinco-eugenol, cimento à base de resina epóxi, cimento de Portland branco e um novo cimento de óxidos bioativos. A toxicidade dos materiais foi avaliada pelo teste de viabilidade celular (MTT) e análise do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) a partir da análise em citômetro de fluxo. As células foram incubadas por 24 horas com extratos dos materiais e os testes elaborados conforme protocolo. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA com interação entre três fatores e determinaram que os materiais apresentaram graus diferentes de toxicidade para células humanas ($p < 0,05$). Não houve correlação entre os resultados obtidos pelo teste MTT e potencial transmembrânico mitocondrial. Esses resultados sugerem que os materiais endodônticos podem retardar o processo de reparo e apenas a análise de teste de viabilidade celular não é suficiente para determinar a citotoxicidade do material.

Palavras-chave: viabilidade celular, técnicas de cultura de células, citometria de fluxo, ligamento periodontal.

1.2 Abstract

The aim of the study was to evaluate the cell viability of human periodontal ligament cells following contact with a new bioactive oxide-based endodontic material, as compared to commonly used endodontic materials, including zinc oxide-eugenol, epoxy resin-based sealers and white Portland cement. Toxicity of the materials was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), as measured by flow cytometry. Cells were incubated for 24-h with material extract prior to viability assessment. Values obtained in individual experimental series were compared using ANOVA with three factor interactions. Results determined that materials have some toxicity effect to human cells ($p < 0.05$). There was no correlation between the measure of viability by MTT assay and viability as measured by $\Delta\Psi_m$. These results suggest that the endodontic material may delay the repair process and that just a viability assay is not sufficient to determine the cytotoxicity to materials.

Keywords: Cell viability; Cell culture techniques; Flow cytometry; Periodontal Ligament

1.3 Introdução

O reparo radicular, após uma perfuração, ocorre com a participação das células do ligamento periodontal, principalmente os fibroblastos e células

mesenquimais indiferenciadas (1). Ambos podem se diferenciar em células tipo-cementoblastos de acordo com o meio (2, 3), mas mantêm uma população com estágios diferentes de diferenciação e linhagem (4). É importante ressaltar que as perfurações não são defeitos de estrutura homogênea, uma vez que envolve a inter-relação de diferentes estruturas (5). O tratamento requer, portanto, o uso de materiais compatíveis com as características da dentina e do periodonto.

Não existe na Endodontia um material único para esse fim. Dos vários materiais utilizados na clínica, os cimentos endodônticos e o mineral trióxido agregado são os mais utilizados nos terços apical e cervical da raiz, respectivamente (6). O mineral trióxido agregado é conhecido como MTA, contudo o cimento de Portland possui uma composição semelhante ao MTA, mas com uma quantidade de metais pesados maior (7). A toxicidade do MTA e do Cimento de Portland já foi demonstrada em diversas pesquisas (8, 9) e demonstrado que pode suprimir a diferenciação de novas células osteoblásticas, apesar de não impedir o crescimento daquelas que se diferenciaram (10).

Um novo material com potencial para reparar perfurações foi desenvolvido na Universidade de Brasília. Este apresenta na composição substâncias com potencial bioativos, destacando-se o cálcio, o fósforo e a sílica (11). Modificações na superfície química influenciam o comportamento celular no momento da colonização superficial, enquanto mudanças iônicas influenciam no processo de calcificação da superfície (12).

Um dos fatores que interfere na biocompatibilidade desses materiais e dos cimentos endodônticos é o tempo de presa porque componentes tóxicos podem permanecer livres até que as reações se completem (13, 14).

O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade das células do ligamento periodontal na presença de quatro materiais: cimento à base de óxido de zinco-eugenol, cimento à base de resina epóxi com hidróxido de cálcio, Cimento de Portland branco e Cimento de óxidos bioativos.

1.4 Materiais e Métodos

1.4.1 Cultura primária de células do ligamento periodontal (PDL)

As células do ligamento periodontal foram obtidas de dois terceiros molares extraídos, de uma mesma pessoa, 34 anos, por motivo de impaction. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília³.

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, a paciente foi instruída a bochechar uma solução de clorexidina a 0,12% por 2 minutos. Cada terceiro molar extraído foi lavado com solução salina esterilizada, tomando-se o cuidado de não manipular as raízes. Após a lavagem foram colocados em um tubo Falcon contendo meio de cultura (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco – Invitrogen Co, EUA] tamponado com bicarbonato de sódio [Sigma-Aldrich, Co, USA] suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, EUA) e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL/ estreptomicina 100 µg/mL, Gibco – Invitrogen, EUA).

Os tubos foram levados ao laboratório de Morfologia e Morfogênese e, dentro da câmara de fluxo laminar (Veco, Brasil), os dentes tiveram a remoção do ligamento periodontal, com auxílio de uma cureta periodontal estéril, dos terços médio e apical das raízes. O material foi colocado em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura e levados à estufa a 37°C, com 5% CO₂ (Tecnal, Brasil). Os frascos foram identificados com o número do dente e a data.

Nos primeiros sete dias houve a troca do meio de cultura diariamente com avaliação morfológica prévia das células aderidas ao frasco de cultura. Ao atingirem a confluência, as células foram transferidas para frascos de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura, caracterizando a primeira transferência (T1).

1.4.2 Preparo das amostras

Os materiais testados foram:

- * Grupo I: controle negativo: ausência de material;

³ Projeto aprovado 030/09 Anexo 3

- * Grupo II: cimento endodôntico à base de óxido de zinco-eugenol (Endofill, Dentsply, Brasil) – lote 792680
- * Grupo III: cimento endodôntico à base de resina epóxi de cálcio (Sealer 26, Dentsply, Brasil) – lote 791827
- * Grupo IV: cimento à base óxidos bioativos (sistema pó-resina, sendo o pó composto por CaO, SiO₂, P₂O₅ [Sigma-Aldrich, Co, USA], hexametilenotetramina [Merck, Alemanha] e BaSO₄ [Sigma-Aldrich, Co, USA]. A resina utilizada foi a resina epóxi. A partir de agora será referido como Sealer α (Universidade de Brasília, Brasil).
- * Grupo V: Cimento de Portland branco (Saint-Gobain Quartzolit Ltda, Brasil) – lote não informado

Todos os materiais foram manipulados em placa de vidro e com espátula nº24, ambos esterilizados. A manipulação foi realizada num único momento na câmara de fluxo laminar, conforme instruções dos fabricantes. O Sealer α acompanhou a forma de preparo do Sealer 26. Os materiais testados foram preparados com quantidade suficiente para preencher o fundo de um poço de uma placa de cultura de células de 12-poços, com espessura aproximada de 1 mm. Foram utilizados 3 poços para cada material e o controle.

As avaliações de viabilidade foram realizadas pela reação das células aos produtos liberados pelos materiais, no meio de cultura, em dois momentos, subdivididos em três períodos de observação, independentes:

- a) Momento I: materiais recém espatulados: períodos de observação 24, 48 e 72 h após a manipulação, em contato com o meio de cultura por 24 h;
- b) Momento II: materiais com presa de 24 h, mantidos em estufa a 37°C com 80% de umidade relativa. Após esse período foi adicionado o meio de cultura para análise 24, 48 e 72 h após a adição do meio, por um período de 24 h.

Sobre os materiais foram colocados 3,4 mL de meio de cultura imediatamente ou após 24 h da manipulação do cimento. A placa contendo os materiais com o meio de cultura foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. A cada 24 h, o meio de cultura que estava em contato com o cimento era recolhido e transferido para um

tubo Falcon, devidamente identificado. As trocas de meio foram realizadas até completar os períodos de observação.

1.4.3 Teste MTT⁴

Após um período de incubação de 24 horas (37°C) das células do ligamento (1 x 10⁴ céls/poço, em placa de 96-poços) com extratos dos materiais recolhidos de cada período, a viabilidade das células do ligamento periodontal foi avaliada pelo Teste MTT. Cada poço da placa recebeu 150 µl de MTT (15µl de MTT [5mg/mL] e 135 µl de meio de cultura). Três horas depois foram adicionados 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) necessários para a dissolução dos cristais de formazan azuis. A leitura foi realizada com densidade óptica de 595 nm. O teste foi realizado em triplicata para cada material testado e controle.

1.4.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)⁵

Após um período de incubação de 24 horas (37°C) das células do ligamento periodontal (6x 10⁴ céls/poço em placa de 12-poços) com extratos dos materiais dos períodos de 48 e 72 horas (Momento I e II), as alterações de morfologia e celular e $\Delta\Psi_m$ foram analisadas por meio de citometria de fluxo. Rodamina 123 (Invitrogen, EUA) (3 µL) foi adicionada a cada poço e incubada por um período de 15 minutos, à temperatura ambiente. A leitura no citômetro de fluxo (FACSCallibur, Becton & Dickenson, EUA) foi realizada com ajuste de intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 515-530 nm (FL1). Os dados obtidos da leitura foram analisados pelo programa CellQuest software versão 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA).

1.4.5 Análise Estatística

A análise dos resultados foi realizada pelo teste ANOVA a três fatores (período-momento-grupo) com interação entre eles com nível de significância $p < 0,05$.

⁴ Anexo 4

⁵ Anexo 4

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Teste MTT.

A partir do 14^o dia de cultivo, foi observada a migração das células na superfície da garrafa de cultivo, e no 28^o as células apresentavam-se confluentes e foi realizada a primeira passagem.

Todos os materiais causaram alterações significativas na atividade da desidrogenase mitocondrial (Tabela 1). A interação entre os três fatores provocou alterações significativas ($p < 0,0001$).

Nas primeiras 24 horas de contato com as células, todos os materiais apresentaram toxicidade maior que o controle ($p < 0,0001$), independente da reação de presa (Figura 1). Os extratos obtidos dos materiais manipulados às 48h e 72h determinaram toxicidades distintas. Para o cimento fresco, os cimentos Sealer 26 e Portland branco não diferem entre si e com o controle a partir de 72 h. Já no Momento II apenas o Cimento Portland branco apresenta semelhança estatística com o controle neste período. Sealer α e Endofill não diferem entre si em todos os períodos observados (Figura 1A).

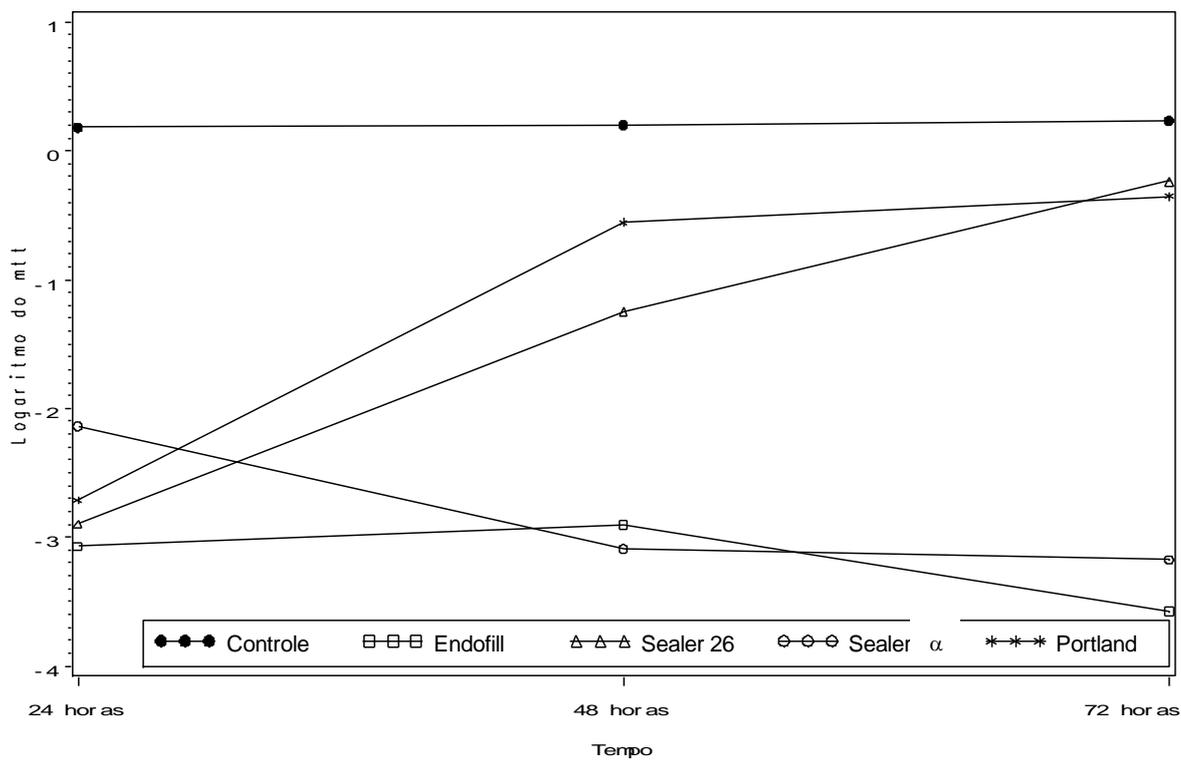
Após a reação de presa, somente o cimento de Portland manteve a uma taxa de células viáveis superior aos demais materiais (Figura 1B).

Tabela 1: Porcentagem da viabilidade celular das células do ligamento periodontal, após contato com extratos de materiais endodônticos pelo teste MTT*

	Momento I			Momento II		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Endofill	3,906±0,739	4,477±0,747	2,232±0,372	5,980±0,196	3,971±0,381	4,244±0,920
Sealer 26	4,598±0,267	23,49±4,634	62,994±9,439	5,850±0,557	3,720±0,345	4,151±0,494
Sealer α	9,861±1,211	3,910±1,497	3,308±0,315	7,941±0,259	4,747±0,495	5,102±0,106
C. Portland	5,596±1,164	46,602±3,015	55,526±4,473	4,673±0,408	43,816±3,699	71,081±18,355

*O controle é considerado como 100% viável.

A



B

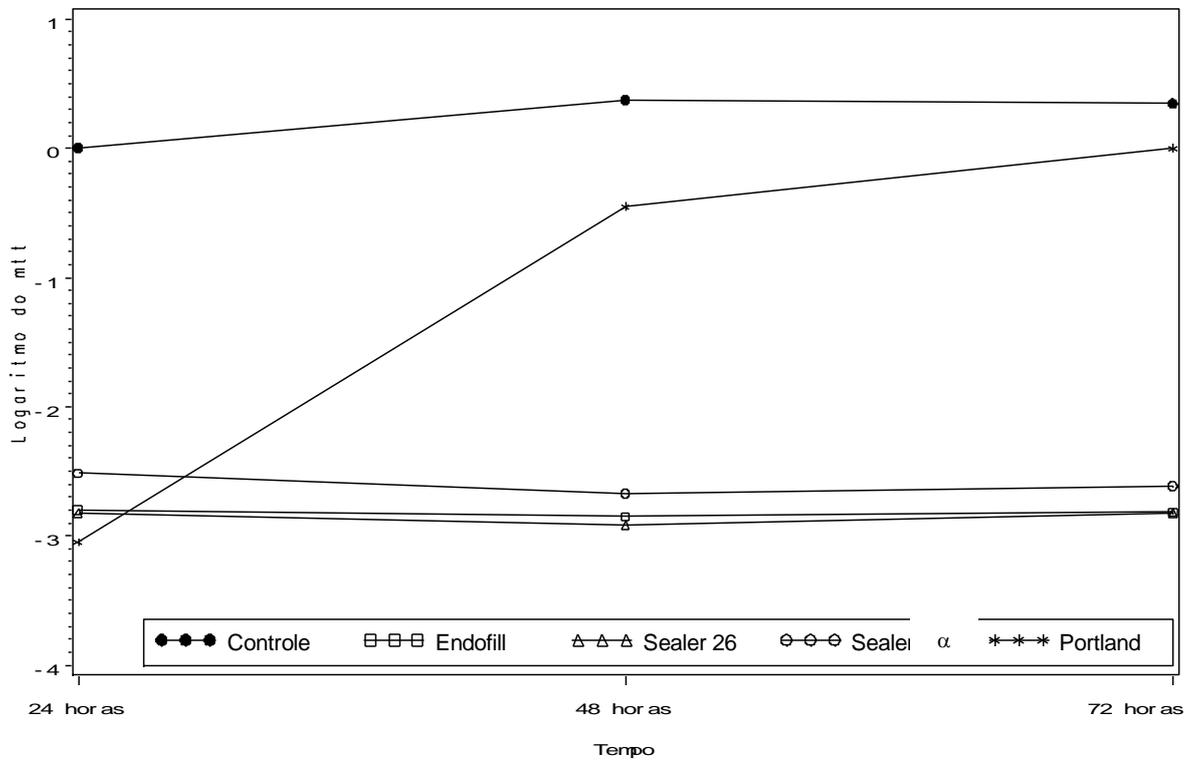


Figura 1: Avaliação de viabilidade das células do ligamento periodontal (teste MTT) após contato com extratos de materiais endodônticos frescos (gráfico A) e após a reação de presa (gráfico B).

1.5.2 Avaliação do $\Delta\Psi_m$

Os dados coletados estão resumidos na Tabela 2 e Figura 2.

A análise estatística demonstrou que apenas a composição do material causa diferenças estatísticas entres os materiais analisados ($p < 0,0001$). Neste contexto, não há diferença estatística significativa entre o grupo Controle e os Cimentos Sealer α e Portland ($p > 0,05$). Sealer 26 e Endofill não diferem entre si ($p > 0,05$)

Tabela 2: Média do $\Delta\Psi_m$ das células do ligamento periodontal após 24 h de contato com materiais endodônticos

Materiais	Momento I		Momento II	
	48 h	72 h	48h	72 h
Controle	66,30929	66,47284	67,16539	64,92656
Endofill	32,64352	26,31561	38,74988	50,92025
Sealer 26	60,17041	28,00133	40,92478	60,51449
Sealer α	38,84725	51,82303	58,67220	61,93046
C. Portland	63,53895	61,57213	63,11763	58,90177

1.6 DISCUSSÃO

Os testes de biocompatibilidade de materiais por meio de cultura de células apresentam como fator limitante a pouca correspondência com o sistema vivo. Uma vez que não apresentam um sistema de defesa atuante, tampouco uma troca de fluidos constante. Desta forma, os resultados tendem a superestimar a toxicidade dos materiais.

No modelo adotado, a utilização de células de ligamento periodontal humano e o recolhimento do meio de cultura em três períodos foram apenas para tentar simular uma situação real do corpo humano. Os trabalhos de biocompatibilidade de materiais geralmente deixam o meio de cultura em contato com o material por 72 horas, em repouso (15, 16). Dessa forma o meio fica estagnado e ocorre um equilíbrio entre soluto e solvente.

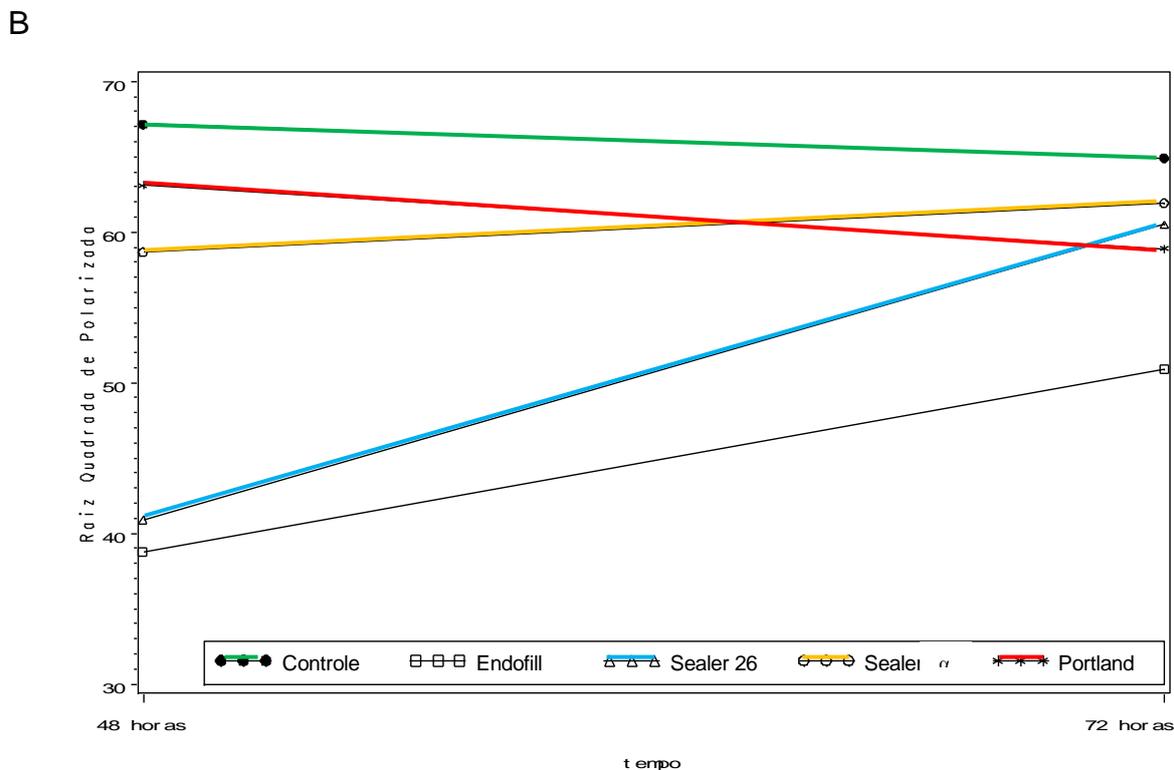
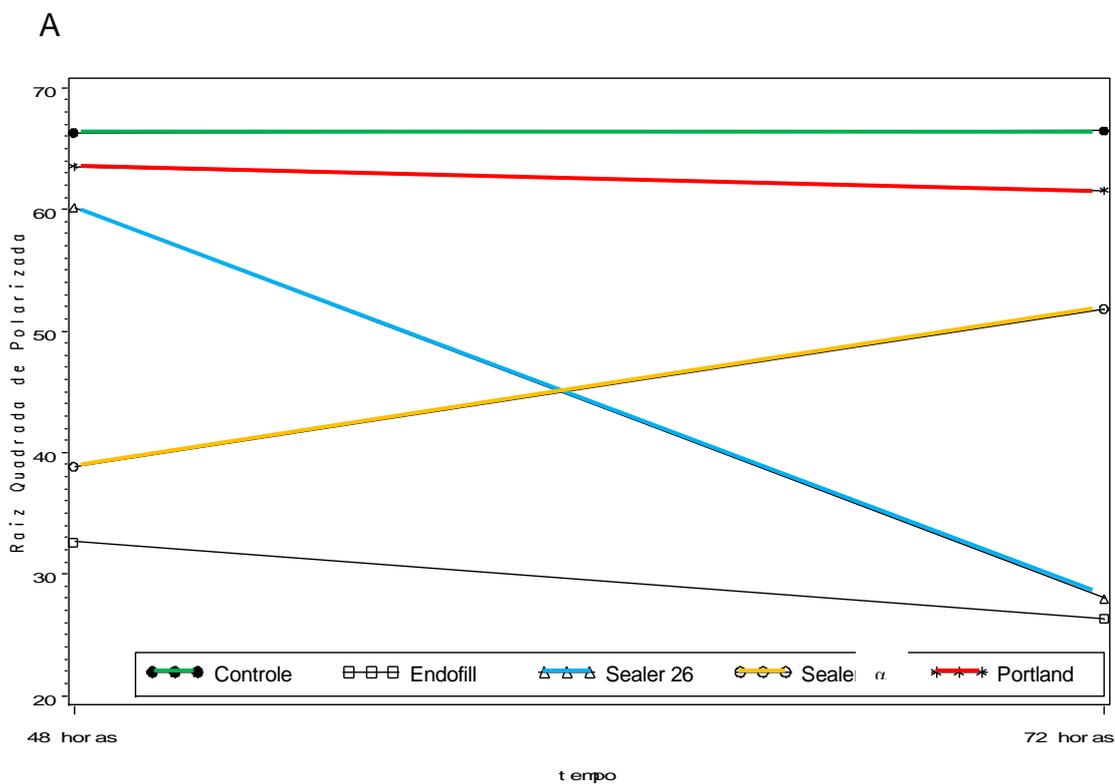


Figura 2: Avaliação do $\Delta\Psi_m$ das células do ligamento periodontal após contato com extratos de materiais endodônticos frescos (gráfico A) e após a reação de presa (gráfico B).

Trocar o meio em três períodos também não é igual à situação *in vivo*, mas força um novo equilíbrio entre o meio de cultura e o material avaliado. Assim, os subprodutos solúveis ou hidrolisáveis podem ser liberados do material em todos os períodos avaliados.

O teste MTT é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas reduzirem sais de tetrazólio (14). O processo de redução não está totalmente elucidado, mas sabe-se que além das desidrogenases mitocondriais participam do processo enzimas da cadeia de transporte de elétrons (17) bem como frações sub-celulares que possuam NADH ou NADPH (18). Dessa forma, não se pode considerar como um teste de função mitocondrial (17), mas é útil como um teste de rastreamento de viabilidade.

Os resultados demonstraram que o Endofill, cimento à base de óxido de zinco-eugenol demonstrou ser o mais tóxico dos materiais testados. O eugenol pode ser liberado durante a reação de presa ou a partir da hidrólise do eugenolato de zinco (19). Sendo um derivado fenólico, o eugenol é incorporado à camada lipídica das membranas celulares alterando a sua permeabilidade (20). A redução da ação do glutatião redutase foi apontada como principal mecanismo indutor de toxicidade do eugenol (21). Da reação de hidrólise também ocorre à liberação do zinco que, em concentrações pequenas, inibe o consumo de oxigênio e altera o $\Delta\Psi_m$ (22)

Vários autores afirmaram que a toxicidade do eugenol é crescente e dose-dependente (20, 21, 23-25), ou seja, quanto mais eugenol utilizado na manipulação, maior a toxicidade. O Endofill não possui uma proporção determinada de pó e líquido para sua utilização. Segundo o fabricante, a proporção pode ser ajustada utilizando mais ou menos eugenol.

O Sealer 26 é um cimento à base de resina epóxi e contem hidróxido de cálcio na composição. Semelhante ao AH 26 apresenta uma toxicidade inicial alta devido à hidrólise do catalisador com liberação de formaldeído e amônia (26). Além do catalisador, a resina epóxi é apresentada como citotóxica devido aos efeitos semelhantes aos estrogênios e por possuir potencial genotóxico (27). Após a presa, o material apresenta uma melhoria na compatibilidade (Figura 1). Ao contrário do que apresenta a literatura, a toxicidade foi maior no Momento II, ou seja, após a presa do material (Figura 1). A solubilidade dos cimentos à base de resina epóxi é maior no pH 7,0 do que outros cimentos endodônticos, após 24 horas de presa (28).

Essa maior solubilidade pode ser responsável pelo aumento da toxicidade do material.

O cimento de óxidos ativos apresentou uma alta toxicidade tanto no Momento I quanto no Momento II (Figura 1). Contudo não é possível prever qual fator é o responsável pela toxicidade porque este foi o único material que reagiu com o meio de cultura. Houve uma descoloração do vermelho de fenol (marcador colorimétrico do pH do meio de cultura) a partir de 48 horas após a manipulação do material. Esse tipo de reação ocorre geralmente na presença de agentes oxidativos ultra-reativos e um fotocatalisador, como a luz ultravioleta, mas em nenhum momento do experimento houve essa fotocatalisação (29). Foi observada uma inibição total da reação de presa do cimento no Momento I e no Momento II, após a colocação do meio de cultura, a superfície sofria uma alteração que a tornava mais amolecida. Estudos mais específicos serão necessários para determinar os componentes do cimento envolvidos neste processo.

O Cimento de Portland branco foi preferido ao cinza porque a liberação de arsênico se mantém dentro do limite tolerado pela ISO 9917-1 (30). Apesar de demonstrar um efeito tóxico menor que o apresentado pelos outros materiais, não significa que seja tão melhor por ter diferido significativamente do controle ($p < 0,0001$) (Figura 1).

Fatores tais como: heterogenicidade celular da cultura; velocidade de metabolismo diferente; células em fases distintas do ciclo celular; diferenças no transporte de substâncias através da membrana e características anti-oxidativas dos materiais podem alterar o resultado do teste MTT (18, 31-33). Talvez estes sejam alguns dos fatores para uma diferença tão marcada entre o teste MTT e a avaliação $\Delta\Psi_m$ encontradas no presente trabalho.

Os resultados demonstraram que o processo de presa e o período avaliado não interferem no $\Delta\Psi_m$. Assim, as diferenças entre o Controle e o Endofill ou o Sealer 26 são derivadas da composição do material. Contudo, em relação ao Sealer 26 fazem-se necessárias pesquisas mais apurada para se estabelecer a causa, uma vez que o Sealer α possui a mesma resina e obteve resultados distintos. Interessante observar que o Sealer α apesar de apresentar um potencial oxidativo maior que os demais materiais, este não foi o suficiente para alterar o $\Delta\Psi_m$. Segundo Novitsky et al (2008) só ocorre uma redução do $\Delta\Psi_m$ em células expostas a uma

concentração de 1mM H₂O₂ (34) e que esta ainda depende da capacidade de fatores anti-oxidativos intracelulares.

Apesar da alteração na viabilidade celular demonstrada pelo teste MTT, a citometria de fluxo revela que a característica fisiológica da mitocôndria fica relativamente preservada. Deste modo pode-se supor que não houve alteração da produção de energia das células ao contato com Sealer α ou com Cimento de Portland.

1.7 CONCLUSÕES

Conclui-se que o cimento de Portland branco causou menor alteração na viabilidade celular e tanto ele quanto o cimento de óxidos bioativos não causam alterações na produção de energia. Não obstante, num processo de selamento de perfuração podem causar alterações patológicas iniciais que retardam o reparo, pelas alterações iniciais de viabilidade.

1.8 REFERÊNCIAS

1. Lossdorfer S, Gotz W, Rath-Deschner B, Jager A. Parathyroid hormone (1-34) mediates proliferative and apoptotic signaling in human periodontal ligament cells in vitro via protein kinase C-dependent and protein kinase A-dependent pathways. *Cell Tissue Res.* 2006;325:469-79.
2. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouil S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-55.
3. Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and HTERT gene transfer. *Cell Tissue Res.* 2006;324:117-25.
4. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research.* 2006;41(303-310):303.
5. Alhadainy HA, Himel VT, Lee WB, Elbaghdady YM. Use of a hydroxylapatite-based material and calcium sulfate as artificial floors to repair furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 1998;86(6):723-9.
6. Lemon R. Nonsurgical repair of perforations defects. Internal matrix concept. *Dental Clinics of North America.* 1992;36(2):439-57.

7. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide and two Portland Cement. *International Endodontic Journal*. 2006;39:213-9.
8. Braz M, Camargo E, Saladori D, Marques M, Ribeiro D. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2006;33:234-9.
9. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho E, Plotkowski M, T C-F. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*. 2005;38:604-9.
10. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, K M, T I. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone related protein mRNAs. *Int Endod J*. 2005;38:203-10.
11. Carneiro DF. Cimento endodôntico à base de biocerâmica. Avaliação das propriedades físicas [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2001.
12. Zreقات H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res*. 1999;44(4):389-96.
13. Barbosa S, Araki S, Spangberg L. Cytotoxicity of some modified root canals sealers and their leachable components. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 1993;75:357-61.
14. Bouillaguet S, Wataha J, Lockwood P, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*. 2004;112:182-7.
15. Souza N, Justo G, Oliveira C, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J*. 2006;39:40-7.
16. Osorio RM, Hefti A, Vertucci F, Shawley A. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod*. 1998;24(2):91-6.
17. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
18. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69:581-93.
19. Hume W. The pharmacological and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *The Journal of the American Dental Association*. 1984;113:789-91.

20. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res*. 1988;67(11):1438-41.
21. Ho Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*. 2006;39:389-93.
22. Dineley KE, Richards LL, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*. 2005;5:55-65.
23. Koulaouzidou E, Papazisis K, Economides N, Beltes P, Kortsaris A. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod*. 2005;31(1):44-6.
24. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblast. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 1995;79:359-66.
25. Keiser K, Johnson C, Tipton D. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2000;26(5):288-91.
26. Spangberg L, Barbosa S, Lavigne G. AH26 releases formaldehyde. *J Endod*. 1993;19(12):596-8.
27. Kostoryz EL, Tong P, Chappelow C, Eick J, Glaros A, Yourtee D. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999;15:363-73.
28. Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J*. 2003;36:660-9.
29. Hachem C, Bocquillon F, Zahraa O, Bouchy M. Decolourization of textile industry wastewater by photocatalytic degradation process. *Dyes and Pigments*. 2001;49:117-25.
30. Bramante C, Demarchi A, Moraes I, Bernadineli N, Garcia R, Spangberg L. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2008;106:909-13.
31. Shoemaker M, Cohen I, Campbell M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;93:381-4.
32. Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolara R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters*. 2003;195:193-9.
33. Kim H, Yoon S, Lee T, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology Letters*. 2009;184:13-7.

34. Novitsky VV, Ryazantseva NV, Chasovskih NY, Starikova EG, Kaygorodova EV, StariKov YV, et al. Modulation of apoptosis of mononuclear cells under conditions of oxidative stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008;145(3):283-6.

Artigo 2

Avaliação das alterações morfológicas das células de ligamento periodontal humano
após contato com materiais endodônticos

Carneiro, D. F.^a; Bezerra, A. C. B.^b

^a Doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasil;

^b Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasil.

“A realidade é como é, não como
desejamos que ela fosse.”
Maquiavel

2.1 Resumo

Objetivo: Os objetivos deste trabalho foram analisar as alterações volumétricas que ocorrem nas células do ligamento periodontal humano após contato com extrato de materiais endodônticos e avaliar as alterações de pH do meio de cultura causadas por estes materiais.

Metodologia: As alterações volumétricas foram analisadas por citometria de fluxo. As células (6×10^4 células/poço) foram incubadas por 24 horas a 37°C , com extratos dos materiais em duas condições de presa (recém espatulados e após 24 horas de presa). A extração foi executada em dois períodos distintos (48 e 72 horas para materiais frescos; 72 e 96 horas para materiais com presa inicial de 24 horas). Depois do contato das células com os extratos, as células foram tripsinizadas e incubadas com $3 \mu\text{L}$ de Rodamina 123 e analisadas sob um comprimento de onda entre 515-530 nm (FL1). O software CellQuest v 3.0.1 foi utilizado para análise dos dados. A análise estatística foi realizada usando teste ANOVA com três fatores de interação. Para análise morfológica as células foram avaliadas em condições de confluência e subconfluência com microscópio de fase invertido. Imediatamente após a obtenção do extrato do material endodôntico, o pH foi medido com auxílio de pHmetro. A média de três medidas (23°C), em repouso, foi considerada pH do extrato.

Resultados: Os resultados demonstraram que os materiais Sealer 26, Sealer α e Endofill provocaram acentuada redução volumétrica ($p < 0,0001$) das células sugestivas de processo apoptótico. Sealer 26, Sealer α e Cimento de Portland também causaram grande alteração no pH do meio de cultura.

Conclusões: Conclui-se que as células do ligamento periodontal sofrem modificação de volume e forma e após contato com materiais endodônticos e que os mesmos são capazes de alterar o pH do meio.

Palavras-chave: morfologia, citometria de fluxo, pH, contração volumétrica

2.2 Abstract

Background and Objective: Root perforation repair with endodontic materials can be change periodontal tissue. The aims of this study were to evaluate the cell shrinkage at human periodontal ligament cells following contact with a new bioactive oxide-based endodontic material as compared to commonly used endodontic materials, and to compare pH changes at the material extract.

Material and Methods: Cell skrinkage was evaluated by observing a loss of cellular volume by flow cytometry. The cells (6×10^4 cells/well) were incubated for 24 hours at 37°C , with material extracts in two conditions (fresh or set stage). The extraction was executed in two distinct time point after mixed (48 e 72 h for fresh material; 72 e 96 h for set stage). After contact, the cells were harvested and incubated with $3 \mu\text{L}$ rodhamine 123 solution and the emission wavelength was adjusted to 515-530 nm (FL1). The CellQuest software v 3.0.1 was used for data analysis. The values obtained were compared using ANOVA with three factor interactions. The loss of cellular volume associated with cytoskeletal breakdown and blebbing of the plasma

membrane was viewed by microscopy. pH was measured at the material extract at varying time intervals with calibrated pHmeter.

Results: Sealer 26, Endofill and a new bioactive oxide-based endodontic material caused significant cell shrinkage ($p < 0.0001$) and morphological changes that suggest apoptosis. Moreover Sealer 26, white Portland cement and a new endodontic material caused pH increase at culture media.

Conclusion: Endodontic materials can cause cell volume changes and pH disruption after contact and this can retard healing.

Keywords: cell shrinkage, flow cytometry, dental materials, pH, cell morphology

2.3 Introdução

A regulação do volume celular é essencial para diversas funções celulares (1). Os mecanismos regulatórios incluem canais iônicos, transporte através da membrana e re-organização do citoesqueleto, além de mecanismos ativos para aumentar (RVI) ou diminuir (RVD) o volume celular (2).

As células respondem por aumento ou diminuição no volume a qualquer perturbação osmótica (1). A diminuição do volume celular pode ser prevenida pela inibição de alguns íons tais como Cl^- , contudo se a redução alcançar 70% do volume original por um período superior a 3 h pode ocorrer ativação do processo de apoptose independente do ligante (3).

O processo apoptótico é geralmente caracterizado por aspectos morfológicos tais como condensação nuclear, fragmentação nuclear, vacuolização da membrana e contração volumétrica da célula (4, 5). A duração do processo pode ser tão curta quanto à mitose (6). De todas essas características apenas a contração volumétrica é comum a todos os tipos celulares (7) e é a única que ocorre em meio isotônico, independente da ativação de caspases e de outras organelas (5). Provavelmente pela ativação de canais K^+ e/ou Cl^- (1).

Materiais endodônticos utilizados no reparo de perfurações radiculares podem alterar o meio a partir da liberação de íons e outros compostos químicos (8, 9). Tais subprodutos podem gerar sinais que levam a ativação de caspases e, conseqüentemente, a apoptose celular (10).

Em um sistema *in vivo*, o processo pode passar despercebido uma vez que o processo apoptótico não ativa a resposta inflamatória (7). Em um sistema *in vitro*, as

alterações do meio podem ser superestimadas por uma eventual concentração de fatores. Apesar disso, é útil como atividade de rastreamento.

Os objetivos desse trabalho foram analisar as alterações volumétricas que ocorrem em células do ligamento periodontal humano após contato com extrato de materiais endodônticos e avaliar as alterações que esses extratos causam no pH do meio de cultura.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Cultura primária de células do ligamento periodontal (PDL)

As células do ligamento periodontal foram obtidas de dois terceiros molares extraídos, de uma mesma pessoa, 34 anos, por motivo de impactação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília⁶.

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, a paciente foi instruída a bochechar uma solução de clorexidina a 0,12% por 2 minutos. Cada terceiro molar extraído foi lavado com solução salina esterilizada, tomando-se o cuidado de não manipular as raízes. Após a lavagem foram colocados em um tubo Falcon contendo meio de cultura (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco – Invitrogen Co, EUA] tamponado com bicarbonato de sódio [Sigma-Aldrich, Co, USA] suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, EUA) e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL/ estreptomicina 100 µg/mL, Gibco – Invitrogen, EUA).

Os tubos foram levados ao laboratório de Morfologia e Morfogênese e, dentro da câmara de fluxo laminar (Veco, Brasil), os dentes tiveram a remoção do ligamento periodontal, com auxílio de uma cureta periodontal estéril, dos terços médio e apical das raízes. O material foi colocado em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura e levados à estufa a 37°C, com 5% CO₂ (Tecnal, Brasil). Os frascos foram identificados com o número do dente e a data.

⁶ Projeto aprovado 030/09 Anexo 3

Nos primeiros sete dias houve a troca do meio de cultura diariamente com avaliação morfológica prévia das células aderidas ao frasco de cultura. Ao atingirem a confluência, as células foram transferidas para frascos de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura, caracterizando a primeira transferência (T1).

2.4.2 Preparo das amostras

Os materiais testados foram:

- * Grupo I: controle negativo: ausência de material;
- * Grupo II: cimento endodôntico à base de óxido de zinco-eugenol (Endofill, Dentsply, Brasil) – lote 792680
- * Grupo III: cimento endodôntico à base de resina epóxi (Sealer 26, Dentsply, Brasil) – lote 791827
- * Grupo IV: cimento à base óxidos bioativos (sistema pó-resina, sendo o pó composto por CaO, SiO₂, P₂O₅ [Sigma-Aldrich, Co, USA], hexametilenotetramina [Merck, Alemanha] e BaSO₄ [Sigma-Aldrich, Co, USA]. A resina utilizada foi a resina epóxi. A partir de agora será referido como Sealer α (Universidade de Brasília, Brasil).
- * Grupo V: Cimento de Portland branco (Saint-Gobain Quartzolit Ltda, Brasil) – lote não informado

Todos os materiais foram manipulados em placa de vidro e com espátula nº24, ambos esterilizados. A manipulação foi realizada num único momento na câmara de fluxo laminar, conforme instruções dos fabricantes. O Sealer α acompanhou a forma de preparo do Sealer 26. Os materiais testados foram preparados com quantidade suficiente para preencher o fundo de um poço de uma placa de cultura de células de 12-poços, com espessura aproximada de 1 mm. Foram utilizados 3 poços para cada material e o controle.

As avaliações de viabilidade foram realizadas pela reação das células aos produtos liberados pelos materiais, no meio de cultura, em dois momentos, subdivididos em três períodos de observação, independentes:

- c) Momento I: materiais recém espatulados: períodos de observação 24, 48 e 72 h após a manipulação, em contato com o meio de cultura por 24 h;

- d) Momento II: materiais com presa de 24 h, mantidos em estufa a 37°C com 80% de umidade relativa. Após esse período foi adicionado o meio de cultura para análise 24, 48 e 72 h após a adição do meio, por um período de 24 h.

Sobre os materiais foram colocados 3,4 mL de meio de cultura imediatamente ou após 24 h da manipulação do cimento. A placa contendo os materiais com o meio de cultura foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. A cada 24 h, o meio de cultura que estava em contato com o cimento era recolhido e transferido para um tubo Falcon, devidamente identificado. As trocas de meio foram realizadas até completar os períodos de observação.

2.4.3 Determinação do volume e da granulosidade celular por citometria de fluxo⁷

Após um período de incubação de 24 horas (37°C) das células do ligamento periodontal (6×10^4 céls/poço em placa de 12-poços) com extratos dos materiais dos períodos de 48 e 72 horas (Momento I e II), as alterações de morfologia celular foram analisadas por meio de citometria de fluxo. Rodamina 123 (Invitrogen, EUA) (3 µL) foi adicionada a cada poço e incubada por um período de 15 minutos, à temperatura ambiente. A leitura no citômetro de fluxo (FACSCallibur, Becton & Dickenson, EUA) foi realizada com ajuste de intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 515-530 nm (FL1). Os dados obtidos da leitura foram analisados pelo programa CellQuest software versão 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA).

A análise dos resultados foi realizada pelo teste ANOVA a três fatores (período-momento-grupo) com interação entre eles com nível de significância $p < 0,05$.

2.4.4 Análise Morfológica

As células incubadas com meio de cultura fresco foram analisadas em condições de subconfluência e confluência, em microscópio de fase invertido (Unico, EUA). As células incubadas com extratos dos materiais foram comparadas com

⁷ Anexo 4

estas quanto à forma, aos prolongamentos, a posição do núcleo e demais aspectos visíveis ao exame microscópico.

A aquisição das imagens foi realizada com uso de câmera digital (Zeiss, Alemanha) acoplada à ocular do microscópio de luz invertida e o software de aquisição Scope (versão 1.0.0.0, 2003).

2.4.5 Análise do pH do extrato.

Imediatamente após a transferência do meio contendo extrato para um tubo falcon foi realizada a medida do pH do extrato com auxílio do pHmetro (Tecnopon, Brasil) Foram realizadas três medidas de cada tubo falcon, à temperatura ambiente média de 23°C, em repouso, até a obtenção do equilíbrio. O pH foi determinado pela média aritmética das três medidas. A análise dos resultados foi realizada pelo teste ANOVA (*two-way*) com nível de significância $p < 0,05$.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Análise Volumétrica

As alterações de volume foram analisadas a partir das alterações do parâmetro *forward-angle light scatter* (FSC), que representa o volume da célula, versus o parâmetro *side-angle light scatter* (SSC), que representa a granulosidade das células (Gráficos 1 a 4).

Na análise dos gráficos 1 e 2 observa-se que os cimentos Sealer 26, Sealer α e Endofill causaram alterações maiores nas células, uma vez que houve uma redução acentuada no volume e na granulosidade das mesmas, sugerindo um processo de apoptose. Não obstante, o processo em relação ao cimento Sealer 26 é um pouco mais lento, pois na análise com após 48 horas, ocorre um aumento do parâmetro SSC característico das alterações iniciais do apoptose.

Já o cimento de Portland branco manteve-se próximo do controle tanto na análise fresco, quanto após a sua presa, apesar do aumento de granulosidade. A análise estatística demonstrou não haver diferença entre o grupo controle e o grupo que ficou em contato com o extrato do cimento de Portland ($p > 0,05$).

As diferenças entre os materiais e o controle foi significativa ($p < 0,0001$) apenas na avaliação individual do grupo (Tabela 1). Tal resultado evidencia que independente do tempo de observação (48 ou 72 h) ou grau de presa (fresco ou presa completa), as alterações volumétricas são derivadas da composição dos materiais e daquilo que os mesmos liberam no meio (Gráfico 5). As médias dos grupos Endofill, Sealer α e Sealer 26 não diferem estatisticamente entre si, mas diferem significativamente dos grupos Controle e cimento de Portland.

Tabela 1: Média de células do ligamento periodontal com morfologia alterada após contato com extrato de materiais endodônticos.

Materiais	Momento I		Momento II	
	48 h	72 h	48 h	72 h
Controle	25,403972	25,198134	25,297732	28,782450
Endofill	44,876393	67,056815	67,309002	66,132093
Sealer 26	53,467319	42,308872	60,686816	60,246130
Sealer α	65,658045	47,068704	60,647104	52,001454
C. Portland	35,693931	21,614481	30,314993	31,897214

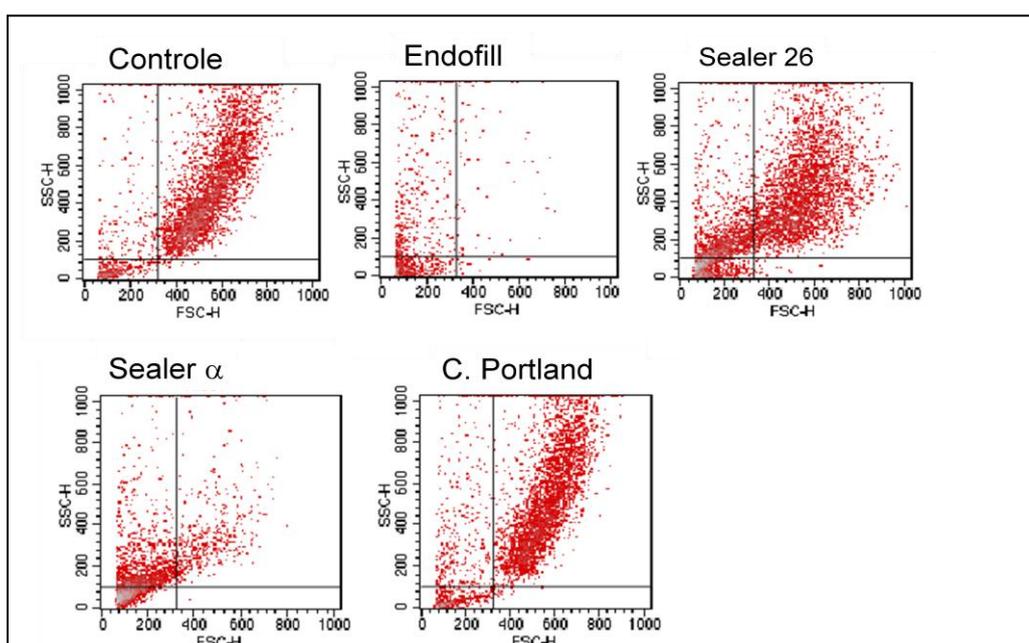


Gráfico 1: Avaliação das alterações volumétricas das células do ligamento periodontal em contato com extrato de materiais endodônticos – Momento I, período 48h.

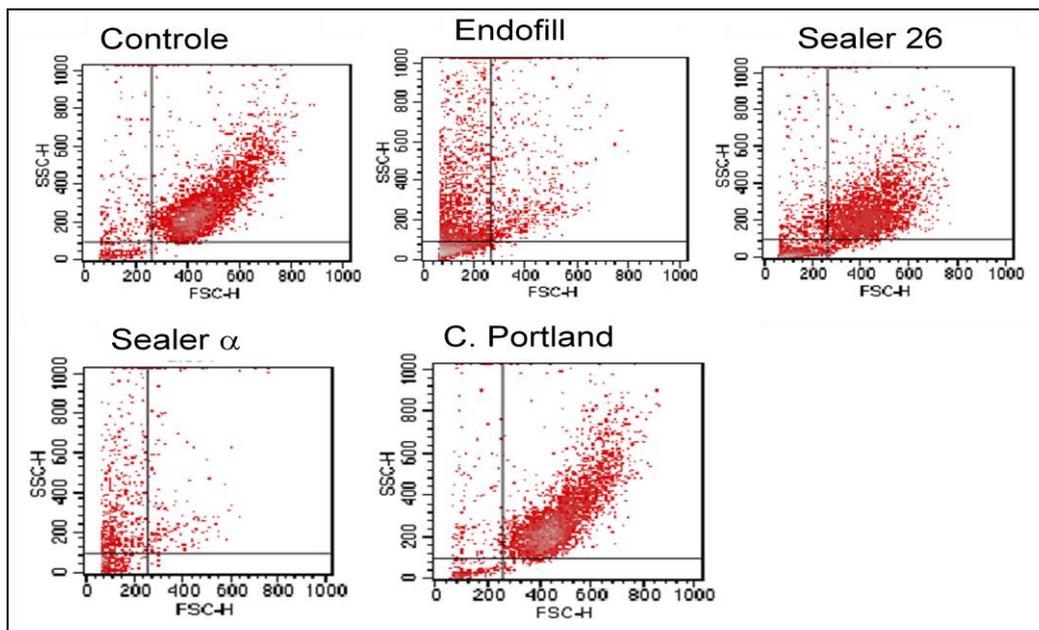


Gráfico 2: Avaliação das alterações volumétricas das células do ligamento periodontal em contato com extrato de materiais endodônticos – Momento I, período 72h.

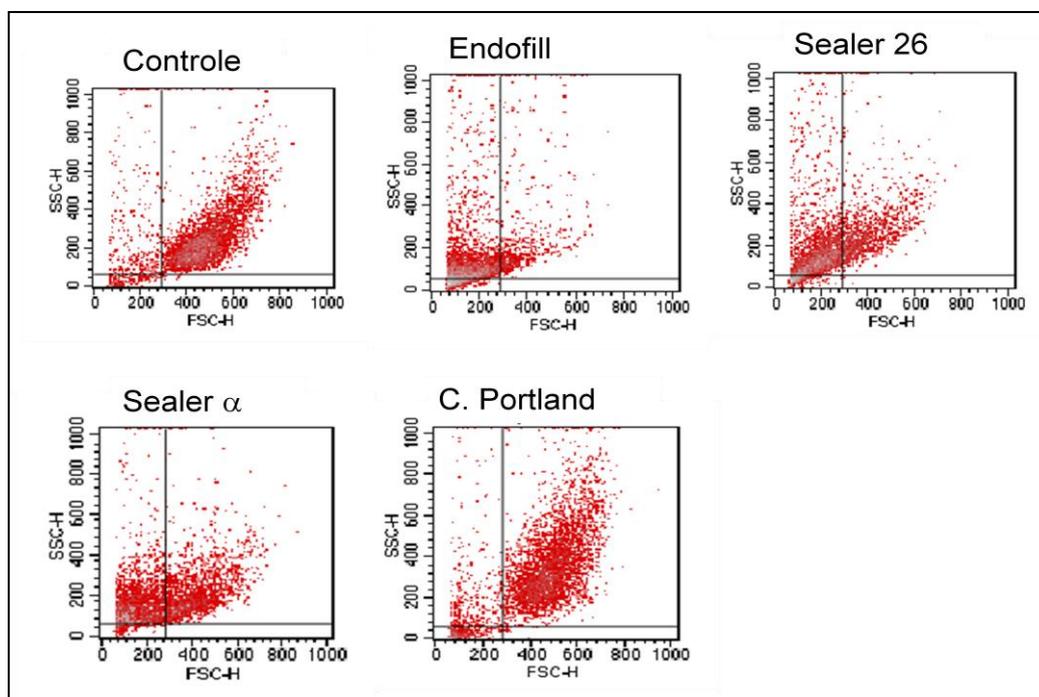


Gráfico 3: Avaliação das alterações volumétricas das células do ligamento periodontal em contato com extrato de materiais endodônticos – Momento II, período 48h.

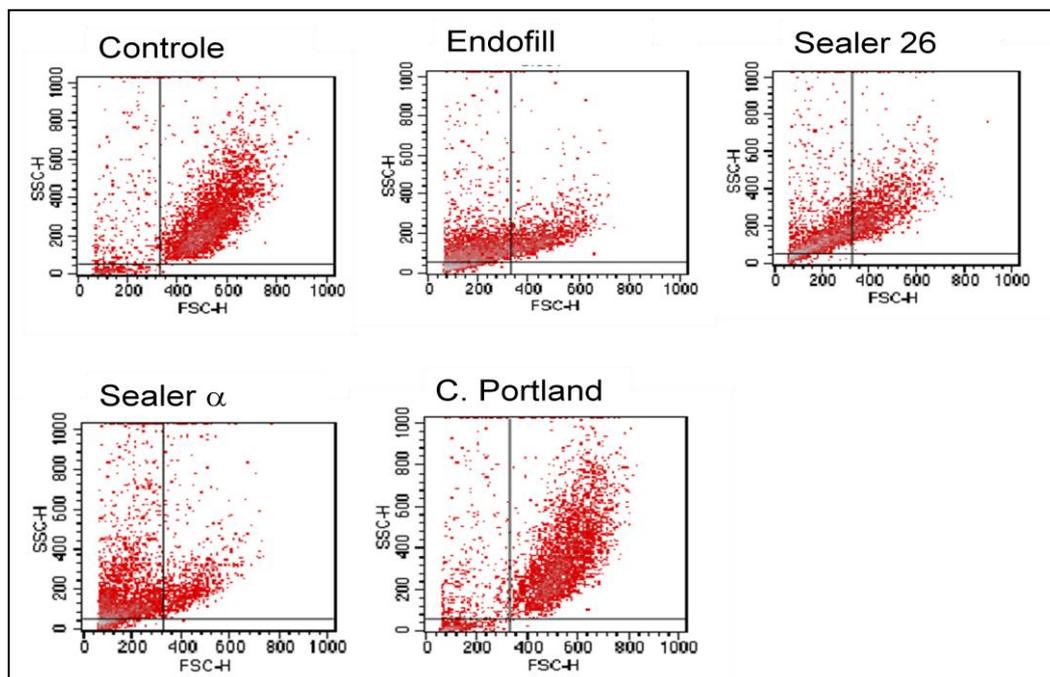


Gráfico 4: Avaliação das alterações volumétricas das células do ligamento periodontal em contato com extrato de materiais endodônticos – Momento II, período 72h.

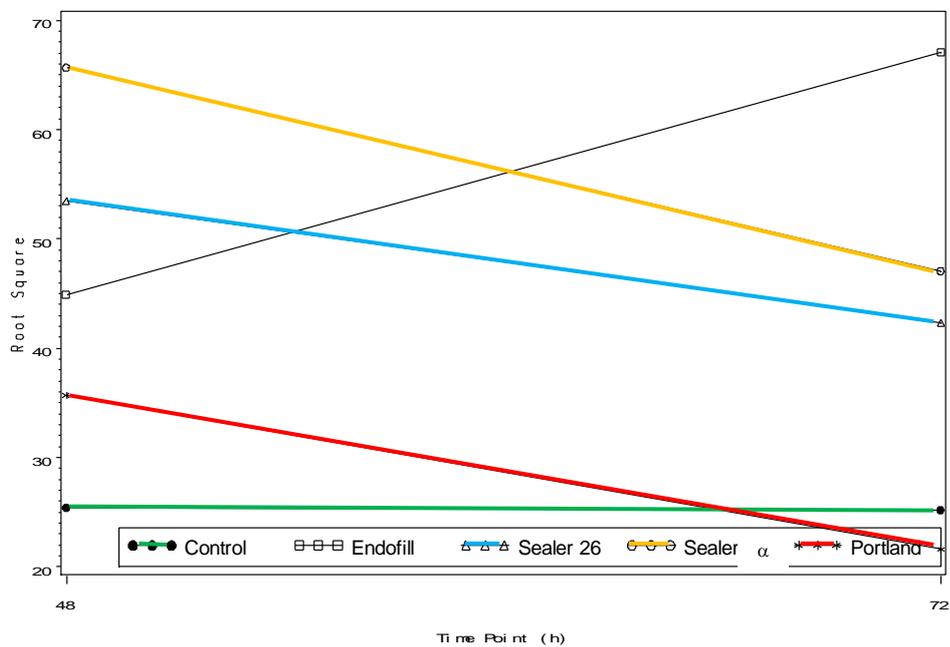
2.5.2 Análise morfológica

As células do controle, em todos os períodos observados apresentaram-se alongadas e com prolongamentos. O núcleo das células, quando visível, apresentou-se centralizado, com o nucléolo evidente (Figura 1A).

As células do ligamento periodontal em contato com extrato do cimento Endofill apresentaram granulações na superfície independente do período observado (Figura 1B).

Em contato com os extratos do cimento Sealer 26, no Momento I, as células apresentaram grandes alterações morfológicas (Figura 1C). Contudo, as maiores modificações morfológicas foram observadas no Momento II com extrato do Sealer 26 (Figura 1D). As células foram perdendo a forma alongada e tornando-se cada vez mais redondas.

A



B

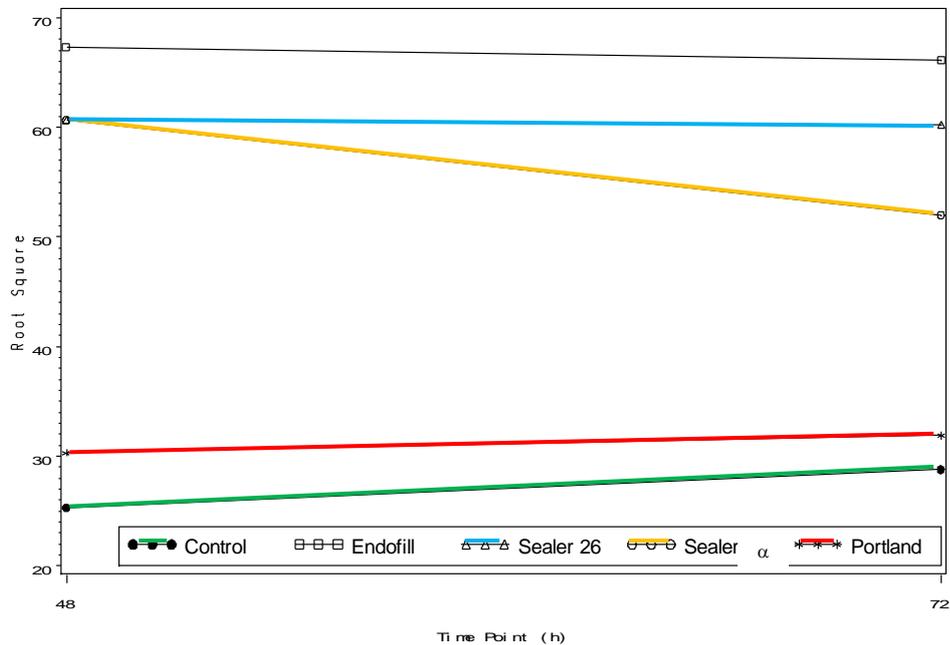


Gráfico 5: Avaliação da alteração volumétrica das células do ligamento periodontal após contato com extratos de materiais endodônticos frescos (gráfico A) e após a reação de presa (gráfico B).

Devido a formação de um gel sobre as células em contato com o Sealer α , não foi possível avaliar a forma das células após o contato com o extrato do material no período de 24 horas, tanto no Momento I quanto no Momento II da avaliação. Nos demais períodos, do Momento I e do Momento II, foram observados que as células perdiam o conteúdo celular e reduziam de tamanho (Figura 1E).

Em contato com os extratos do Cimento de Portland, as células do ligamento periodontal apresentaram uma redução do volume, mas a forma alongada foi preservada (Figura 1F).

2.5.3 Análise do pH

As médias do pH do meio de cultura após o contato com o material endodôntico estão resumidos nos Gráficos 6 e 7.

A alteração de pH do meio provocada pelos materiais frescos foi significativa entre os grupos ($p = 0,0427$). Contudo não houve diferença entre os períodos analisados (Gráfico 6).

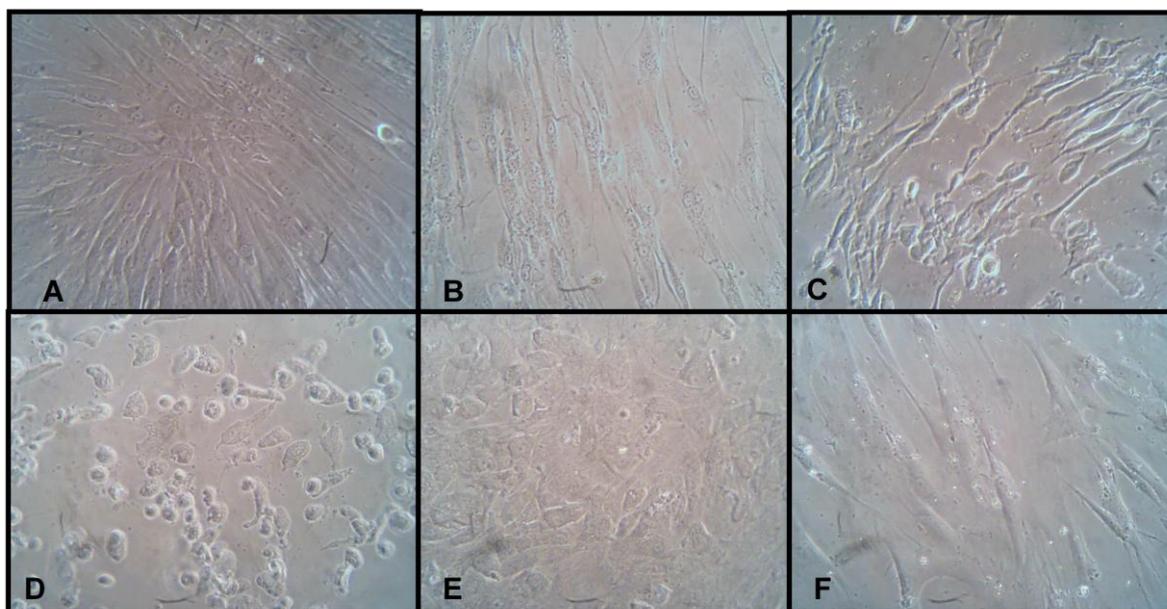


Figura 1: Aspecto morfológico das células do ligamento periodontal humano após contato com extrato de materiais endodônticos (Momento II). (A) Controle (72 h); (B) Endofill (72 h); (C e D) Sealer 26 (48 e 72 h); (E) Sealer α (72 h) e (F) cimento de Portland (72 h), 200x.

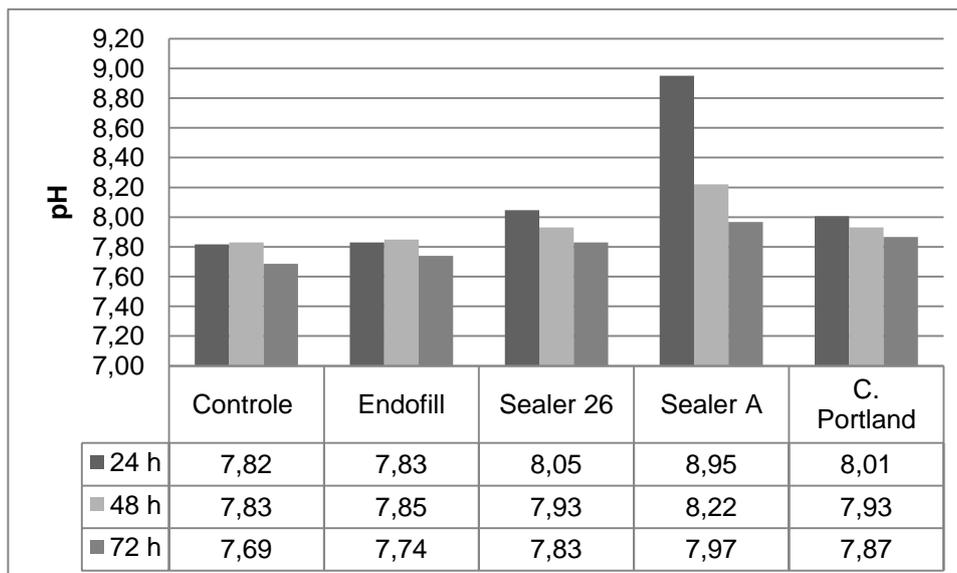


Gráfico 6: Variação do pH do meio de cultura após 24 horas de contato com material endodôntico fresco (Momento I). (Temperatura média 23,6°C)

Quando se avalia o pH do meio de cultura após o período de 24 horas (Gráfico 7) em que os materiais foram mantidos na estufa, em repouso, observa-se que houve diferença estatística tanto entre os grupos ($p = 0,0139$) quanto entre os períodos ($p = 0,0245$).

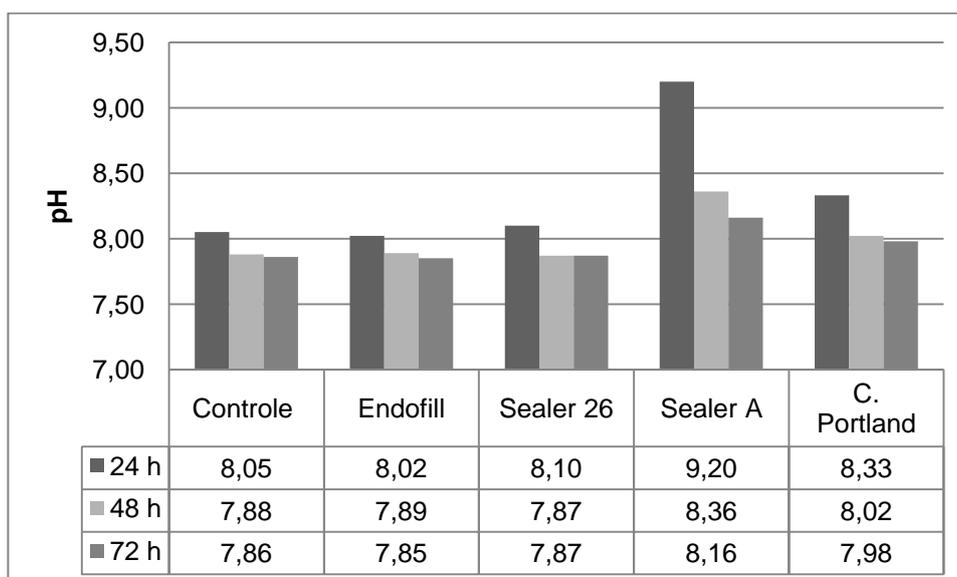


Gráfico 7: Variação do pH do meio de cultura após 24 horas de contato com material endodôntico após 24 h de reação de presa (Momento II). (Temperatura média 23,2°C)

2.6 Discussão

A perda do volume celular provoca uma série de alterações internas como alterações no citoesqueleto celular, e posteriormente perda do potencial de membrana mitocondrial (11). A liberação de substâncias tóxicas, a partir dos materiais, afeta não só a morfologia celular, mas o comportamento de adesão das células (12). A adesão das células ao substrato é fundamental para o processo de reparo e é indicativo da biocompatibilidade dos materiais (13). A proliferação e migração dos fibroblastos do ligamento periodontal são pré-requisitos para a síntese e remodelamento da estrutura protéica do ligamento periodontal (14).

Dentre as causas para alteração volumétrica das células destacam-se as alterações iônicas do meio, o processo apoptótico e o pH. Alterações no pH são capazes de alterar diversas funções celulares incluindo a proliferação e diferenciação celulares (15).

As células do ligamento periodontal apresentam crescimento ótimo no pH 7,4 (16). Acima de 7,8 as células demonstram alterações fisiológicas e morfológicas sugestivas de processos apoptóticos (14), provavelmente independente da ativação da caspase-3 porque esta tem sua atividade inibida no pH acima de 7,6 (17).

Em relação ao pH, todos os materiais alteram o meio, contudo o sistema tampão do mesmo minimiza o efeito. O mais utilizado é o tampão de bicarbonato que converte o CO₂ da atmosfera e mantém o pH ótimo (18). Fora da estufa de crescimento, a concentração de CO₂ se altera e, portanto, o pH. Por isso o pH do controle apresentou-se acima do ideal no experimento.

Os cimentos Sealer 26, Sealer α e cimento de Portland branco provocaram as maiores alterações no pH. Todos três possuem cálcio na composição, na forma de óxido ou hidróxido, que representa o agente da modificação. As diferenças entre eles são relativas às outras características do material que podem manter a [OH⁻] na superfície por períodos variáveis (19, 20).

A análise desses íons liberados é importante não só pela alteração do pH do meio, mas porque a movimentação iônica através da membrana celular pode alterar

o seu metabolismo e favorecer a contração volumétrica (7). Neste estudo, foi verificado que apenas a composição era responsável pelas alterações volumétricas, mas não é possível afirmar se a alteração se deve a algum componente tóxico específico do cimento ou somente a alteração do pH ou ambos.

A alteração volumétrica observada, neste estudo, foi a contração volumétrica. Na citometria de fluxo, a análise dos parâmetros FSC e SSC é capaz de identificar tanto processos necróticos quanto os processos apoptóticos (6, 21). Na necrose ocorre aumento rápido de FSC, por causa do edema, e diminuição do SSC, pela fragmentação de organelas. Enquanto que no processo apoptótico ocorre, inicialmente, uma diminuição de FSC devido à contração celular e um aumento de SSC pela condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Em aspecto tardio do processo e a diminuição de ambos os parâmetros.

Contudo, havendo uma alteração na osmolaridade do meio pode ocorrer uma diminuição do volume celular seguida de uma resposta *regulatory volume increase* (RVI), sem que aja o desencadeamento do processo de morte celular (7). Assim, outros estudos seriam necessários para verificar o comportamento das células do ligamento periodontal humanos sob alterações osmóticas. A diminuição do volume celular verificada neste trabalho, após o contato com extratos de materiais, pode desencadear ou não o processo apoptótico dependendo da capacidade regulatória da célula.

As alterações morfológicas apresentadas pelas células em contato com extrato de óxido de zinco-eugenol são corroboradas por trabalhos anteriores (22, 23), bem como o comportamento das células na presença de extratos de cimento de Portland (12, 22). As alterações observadas nas células que ficaram em contato com o Endofill são sugestivas de estarem sofrendo processo apoptótico devido à quantidade de granulações, semelhantes a bolhas, na superfície. É como se estivesse ocorrendo à liberação de corpos apoptóticos. Em relação ao Sealer 26 ficou nítida a morte das células pela desorganização do citoesqueleto. Presença de vacúolos na superfície e a alteração da forma celular sugerem a toxicidade do material (12).

2.7 Conclusões

A partir dos resultados conclui-se que, com exceção do cimento de Portland, as células do ligamento periodontal sofrem modificação de volume e de forma após o contato com materiais. Em relação ao pH, materiais que contêm cálcio na composição são capazes de alterar o pH do meio de cultura.

2.8 Referências

1. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 2001;532.1:3-16.
2. Gómez-Angelats M, Bortner C, Cidlowski J. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(33-42):33.
3. Ernest N, Habela C, Sontheimer H. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. *J Cell Sci.* 2008;121(3):290-7.
4. Henery S, George T, Hall B, Baiji D, Ortyrn W, Morissey P. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis.* 2008;13:1054-63.
5. Bortner C, Cidlowski J. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2007;462:176-88.
6. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997;27:1-20.
7. Bortner C, Cidlowski J. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:1549-59.
8. Fridland M, Rosado R. Mta solubility: a long term study. *J Endod.* 2005;31(5):376-9.
9. Carneiro D, Barbosa S. Avaliação do pH dos cimentos endodônticos e considerações clínicas. *Robrac.* 1998;7(24):6-10.
10. Vaux D. Apoptosis and toxicology - what relevance? *Toxicology.* 2002;181-182:3-7.
11. Bortner C, Cidlowski J. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21953-62.

12. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscopy study. *J Endod.* 2004;30(1):25-9.
13. Safavi K, Spangberg L, Sapounas G, MacAlister T. In vitro evaluation of biocompatibility and marginal adaptation of root retrofilling materials. *J Endod.* 1988;14:538-42.
14. Lencheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1995;103:148-55.
15. Cutaia M, Black A, Cohen I, Cassai N, Shidu G. Alkaline stress-induced apoptosis in human pulmonary artery endothelial cells. *Apoptosis.* 2005;10:1457-67.
16. Lencheden A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts in vitro. *Scand J Dent Res.* 1994;102:130-6.
17. Segal M, Beem E. Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:1196-204.
18. Cartwright T, Shah G. Culture media. In: Davis J, editor. *Basic cell culture - a practical approach.* New York: Oxford University Press; 1994. p. 57-91.
19. Tay F, Pashley D, Rueggeberg F, Loushine R, Weller R. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod.* 2007;33:1347-51.
20. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999;44(4):389-96.
21. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death. *Journal of Immunological Methods.* 2000;243:167-90.
22. Koh E, Torabinejad M, Pitt Ford T, Brady K, McDonald F. Mineral Trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:432-9.
23. Koulaouzidou E, Papazisis K, Economides N, Beltes P, Kortsaris A. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod.* 2005;31(1):44-6.

Artigo 3

Avaliação da genotoxicidade de materiais endodônticos com células de ligamento periodontal humano.

Carneiro, D. F.^a; Bezerra, A. C. B.^b

^a Doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasil;

^b Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasil.

Título original⁸:

Genotoxicity of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro

Enviado para International Endodontic Journal

“Cada palavra ou conceito, por mais nítido que pareçam, só possuem uma faixa limitada de aplicabilidade.”

Werner Heisenberg

⁸ Anexo 6

3.1 Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a genotoxicidade de um novo material endodôntico à base óxidos bioativos e comparando-o com materiais endodônticos utilizados em clínica sobre células de ligamento periodontal humano.

Metodologia: A genotoxicidade foi avaliada a partir das alterações no ciclo celular e nos danos ao DNA analisadas por citometria de fluxo. As células (6×10^4 células/poço) foram incubadas por 24 horas a 37°C, com extratos dos materiais em duas condições de presa (recém espatulados e após 24 horas de presa). A extração foi executada em dois períodos distintos (48 e 72 horas para materiais frescos; 72 e 96 horas para materiais com presa inicial de 24 horas). Depois do contato das células com os extratos, as células foram tripsinizadas e incubadas com 200 μ L de solução de iodeto de propídio e analisadas sob um comprimento de onda entre 560-580 nm (FL2). O software CellQuest v 3.0.1 foi utilizado para análise dos dados. A análise estatística foi realizada usando teste ANOVA com três fatores de interação.

Resultados: Os resultados demonstraram que os materiais causam danos ao DNA das células pela interação dos três fatores (composição química, reação de presa, período analisado) ($p < 0,0001$). Em relação ao ciclo celular as alterações ocorreram principalmente quando o material estava fresco. O cimento à base óxido de zinco-eugenol foi o mais tóxico dos materiais analisados e o novo material foi o que causou os menores danos ao ciclo celular, principalmente após a presa do material.

Conclusões: O novo cimento à base de óxidos bioativos causou os menores danos ao DNA e ao ciclo celular das células podendo ser utilizado como material de reparo de perfurações.

Palavras-chave: cultura de células; material endodôntico; citometria de fluxo; genotoxicidade

3.2 Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the genotoxicity of a new bioactive oxide-based endodontic material as compared to commonly used endodontic materials in human periodontal ligament cells.

Methodology: Genotoxicity was evaluated by observing cellular DNA content and the cell cycle changes by flow cytometry. The cells (6×10^4 cells/well) were incubated for 24 hours at 37°C, with material extracts in two conditions (fresh or set stage). The extraction was executed in two distinct time point after mixed (48 e 72 h for fresh material; 72 e 96 h for set stage). After contact, the cells were harvested and incubated with 200 μ L propidium iodide solution and the emission wavelength was adjusted to 560-580 nm (FL2). The CellQuest software v 3.0.1 was used for data analysis. The values obtained in the individual experimental series were compared using ANOVA with three factor interactions.

Results: The results demonstrated that all of the materials caused changes to the DNA from an interaction among three different factors (chemical composition, setting reaction, and time point) ($p < 0.0001$). The cell cycle changes occurred primarily when the materials were freshly mixed. A new bioactive sealer did not differ from the

control after the set material on all cycle phases ($p > 0.05$). Zinc oxide eugenol-based sealer is the most genotoxic material.

Conclusion: The new bioactive oxide-based endodontic material did not induce a significant DNA damage or changes on cell-cycle. This is confirming its adequacy as a perforation root repair material.

Keywords: Cell culture; Dental materials; Flow cytometry; Genotoxicity.

3.3 Introdução

Após processos patológicos, a área lesada é reparada por complexos mecanismos de migração, adesão, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares (1). Quando o reparo ocorre nas estruturas periodontais o processo se torna mais complexo devido à estreita relação entre as estruturas dentárias e periodontal (2).

A matriz cementária é capaz de influenciar a diferenciação de células mesenquimais e exibe propriedades indutivas importantes para adesão e regeneração do novo tecido (3). Além disso, proteínas não-colágenas do cimento são capazes de influenciar a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, excluindo fenótipos indesejados, além de providenciar sinais essenciais para a ligação com o tecido conjuntivo (3-7).

Durante o processo de reparo radicular, dependendo da destruição do cimento, componentes da matriz dentinária serão necessários para indução da formação de um tecido tipo-cimento celular (8).

Os fibroblastos do ligamento periodontal são responsáveis pela homeostase e regeneração do ligamento. Existe ainda uma população de células no ligamento periodontal que secretam fatores necessários para a regulação ou inibição da mineralização (9).

Um tipo de agressão que o periodonto está sujeito a sofrer é a perfuração radicular, iatrogenia dos tratamentos endodônticos e protéticos. As perfurações podem ser seladas com variados materiais endodônticos, que devem possuir características que não retarde, impeça ou modifique negativamente o processo de reparo.

Dessa forma, não devem induzir alterações bioquímicas na matriz cementária que resultem na perda da atividade da mesma (1). Também não devem induzir

alterações biológicas nas células envolvidas no processo. Dentre as várias alterações, aquelas conhecidas como genotóxicas se revestem de singular importância na avaliação de compatibilidade.

Materiais citotóxicos podem causar extenso dano ao DNA celular (10). Estes danos podem iniciar a morte celular pela ativação de fatores transcriptivos ou independente destes (11, 12).

O dano ao DNA celular pode interromper o ciclo celular (13). A análise do ciclo celular é utilizada para determinar a capacidade proliferativa da célula. O ciclo pode ser dividido em 4 estágios: G1 (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G2 (pós-síntese de DNA) e M (mitose). A indução do apoptose induzida por danos no DNA pode ocorrer conforme pontos de verificação do ciclo, na fase S (impedindo a entrada no ciclo ou prevenindo a replicação de DNA) ou na fase M (impedindo a mitose) (12).

Cimentos endodônticos e o mineral trióxido agregado (MTA) são utilizados, com frequência, na clínica para selamento das perfurações nos terços apical e cervical, respectivamente. Cimento de Portland é similar ao MTA, mas possui uma quantidade maior de metais pesados na composição (14). Várias pesquisas demonstraram que o MTA não causa danos ao DNA (15, 16). Os cimentos à base de óxido de zinco-eugenol e à base de resina epóxi são descritos como genotóxicos (17, 18).

Materiais bioativos possuem a habilidade de estabelecer uma relação com os tecidos induzindo uma resposta específica, como a formação de osso (19). Possuem na composição cálcio e fósforo, às vezes acrescido de sílica e magnésio (20). Tais modificações químicas influenciam no comportamento celular ou no processo de calcificação (21). Na Universidade de Brasília, um novo material à base de óxidos bioativos foi desenvolvido com o intuito de reparar perfurações e como material retro-obturador. Resina epóxi foi usada como veículo devido à facilidade de aplicação e por providenciar adesão na dentina (22).

O objetivo desse trabalho é avaliar as alterações nas fases do ciclo celular e no conteúdo do DNA de células do ligamento periodontal humano induzidas por quatro materiais endodônticos: dois cimentos endodônticos (Endofill® e Sealer 26®) e dois materiais para selamento de perfurações (Cimento de Portland branco e Sealer α).

3.4 Materiais e Métodos

3.4.1 Cultura Primária de Células do Ligamento Periodontal (PDL)

As células do ligamento periodontal foram obtidas de dois terceiros molares extraídos, de uma mesma pessoa, 34 anos, por motivo de impactação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília⁹

Cada terceiro molar extraído foi lavado com solução salina estéril, tomando-se o cuidado de não manipular as raízes. Após a lavagem foram colocados em um tubo Falcon contendo meio de cultura (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco – Invitrogen Co, EUA] tamponado com bicarbonato de sódio [Sigma-Aldrich, Co, USA] suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, EUA) e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL/ estreptomicina 100 µg/mL, Gibco – Invitrogen, EUA). Os tubos foram levados ao laboratório de Morfologia e Morfogênese e, dentro da câmara de fluxo laminar (Veco, Brasil), os dentes foram inseridos em frascos de cultura de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura e levados à estufa a 37°C, com 5% CO₂ (Tecnal, Brasil). Os frascos foram identificados com o número do dente e a data.

Nos primeiros sete dias houve a troca do meio de cultura diariamente com avaliação morfológica prévia das células aderidas ao frasco de cultura.

Ao atingirem a confluência, as células foram transferidas para frascos de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura, caracterizando a primeira transferência (T1). Os dentes foram colocados em outro frasco de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura e levados à estufa. Estes eram analisados diariamente para avaliação da liberação de células da superfície da raiz.

Este procedimento foi realizado até ser observada a ausência de células migrando a partir do dente.

3.4.2 Preparo das amostras

Os materiais testados foram:

- * Grupo I: controle negativo: ausência de material;

⁹ Anexo 3

- * Grupo II: cimento endodôntico à base de óxido de zinco-eugenol (Endofill, Dentsply, Brasil) – lote 792680
- * Grupo III: cimento endodôntico à base de resina epóxi (Sealer 26, Dentsply, Brasil) – lote 791827
- * Grupo IV: cimento à base óxidos bioativos (sistema pó-resina, sendo o pó composto por CaO, SiO₂, P₂O₅ [Sigma-Aldrich, Co, USA], hexametilenotetramina [Merck, Alemanha] e BaSO₄ [Sigma-Aldrich, Co, USA]. A resina utilizada foi a resina epóxi. A partir de agora será referido como Sealer α (Universidade de Brasília, Brasil).
- * Grupo V: Cimento de Portland branco (Saint-Gobain Quartzolit Ltda, Brasil) – lote não informado

Todos os materiais foram manipulados em placa de vidro e com espátula nº24, ambos esterilizados. A manipulação foi realizada num único momento na câmara de fluxo laminar, conforme instruções dos fabricantes. O Sealer α acompanhou a forma de preparo do Sealer 26. Os materiais testados foram preparados com quantidade suficiente para preencher o fundo de um poço de uma placa de cultura de células de 12-poços, com espessura aproximada de 1 mm. Foram utilizados 3 poços para cada material e o controle.

As avaliações de viabilidade foram realizadas pela reação das células aos produtos liberados pelos materiais, no meio de cultura, em dois momentos, subdivididos em três períodos de observação, independentes:

- e) Momento I: materiais recém espatulados: períodos de observação 24, 48 e 72 h após a manipulação, em contato com o meio de cultura por 24 h;
- f) Momento II: materiais com presa de 24 h, mantidos em estufa a 37°C com 80% de umidade relativa. Após esse período foi adicionado o meio de cultura para análise 24, 48 e 72 h após a adição do meio, por um período de 24 h.

Sobre os materiais foram colocados 3,4 mL de meio de cultura imediatamente ou após 24 h da manipulação do cimento. A placa contendo os materiais com o meio de cultura foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. A cada 24 h, o meio de cultura que estava em contato com o cimento era recolhido e transferido para um

tubo Falcon, devidamente identificado. As trocas de meio foram realizadas até completar os períodos de observação.

3.4.3 Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo¹⁰

Foi incubada, em placa de 12-poços, uma densidade de 6×10^4 cél/poço por um período de 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido e adicionado em cada poço 1 mL do extrato do material endodôntico avaliado ou do meio de controle. O conjunto foi incubado por 24 horas (37°C). Transcorrido esse período as células foram tripsinizadas e incubadas com 200 µL solução de iodeto de propídeo (PI) (20 µg/mL PI e 0,1% X-100 em solução salina tamponada) por 30 minutos, à temperatura ambiente, antes da leitura. A leitura no citômetro de fluxo (FACSCallibur, Becton & Dickenson, EUA) foi realizada com ajuste de intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda de 560-580 nm (FL2) com detecção de 10000 eventos. Os dados obtidos da leitura foram analisados pelo programa CellQuest software versão 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA).

Os resultados adquiridos foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com fator de correção de Turkey para três fatores. O nível de significância foi estabelecido com $p < 0,05$.

3.5 Resultados

A partir do 14º dia foi possível verificar as células se estendendo a partir das raízes e com 28 dias de cultura houve confluência das células.

3.5.1 Fragmentação de DNA

A média do conteúdo celular está relacionada na Tabela 1. Houve interação tripla entre os três fatores (grupo, momento e período) ($p < 0,0001$) na análise da fragmentação de DNA (Tabela 1 e Figura 1).

¹⁰ Anexo 4

Todas as análises do Momento I apresentaram diferenças significativas entre os materiais endodônticos e o controle, exceto o Sealer α no período de 48 h (Tabela 1 e Figura 2A).

A diferença entre o Sealer α e o controle também foi observada no Momento II (Tabela 1 e Figura 2B). A diferença foi de 64,2% no período de 48 h, reduzindo para 15,9% no período de 72 h (Figura 1). Os demais cimentos mantiveram a diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 1: Genotoxicidade dos materiais endodônticos sobre as células do ligamento periodontal humano*

Material	Conteúdo de DNA celular			
	Momento I		Momento II	
	48h	72h	48h	72h
Controle	490.00000	2865.66667	2919.00000	5904.66667
Endofill	9969.66667	9891.00000	9662.66667	9983.00000
Sealer 26	2999.00000	4952.33333	6575.33333	7664.66667
Sealer α	1650.00000	9707.00000	1045.00000	4965.66667
C. de Portland	2208.33333	5726.00000	8171.00000	9135.33333

* Raiz quadrada da media do conteúdo celular de DNA

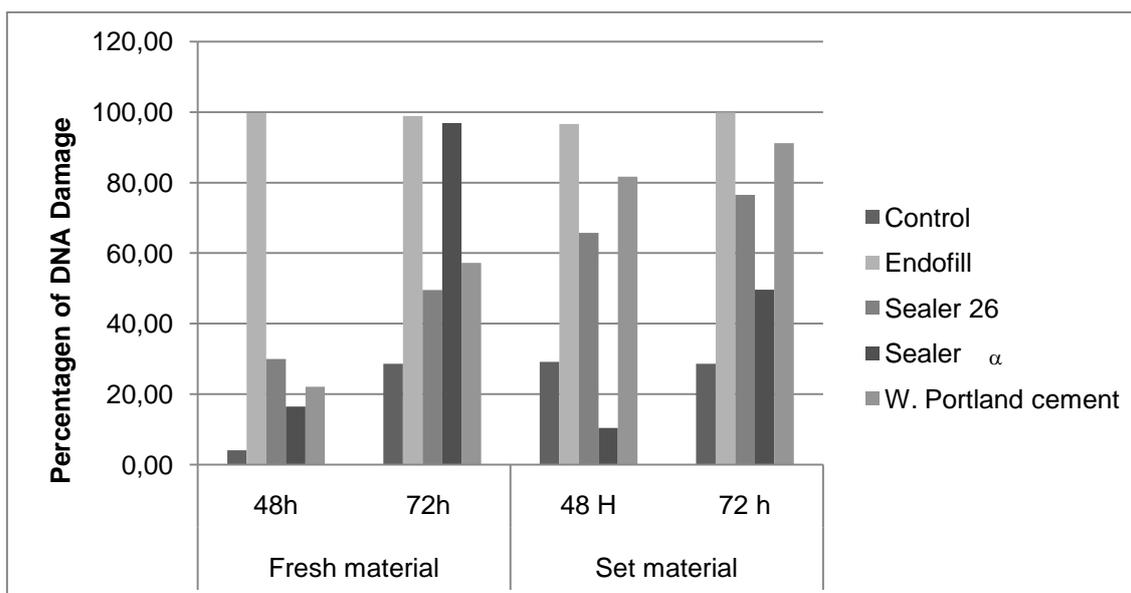
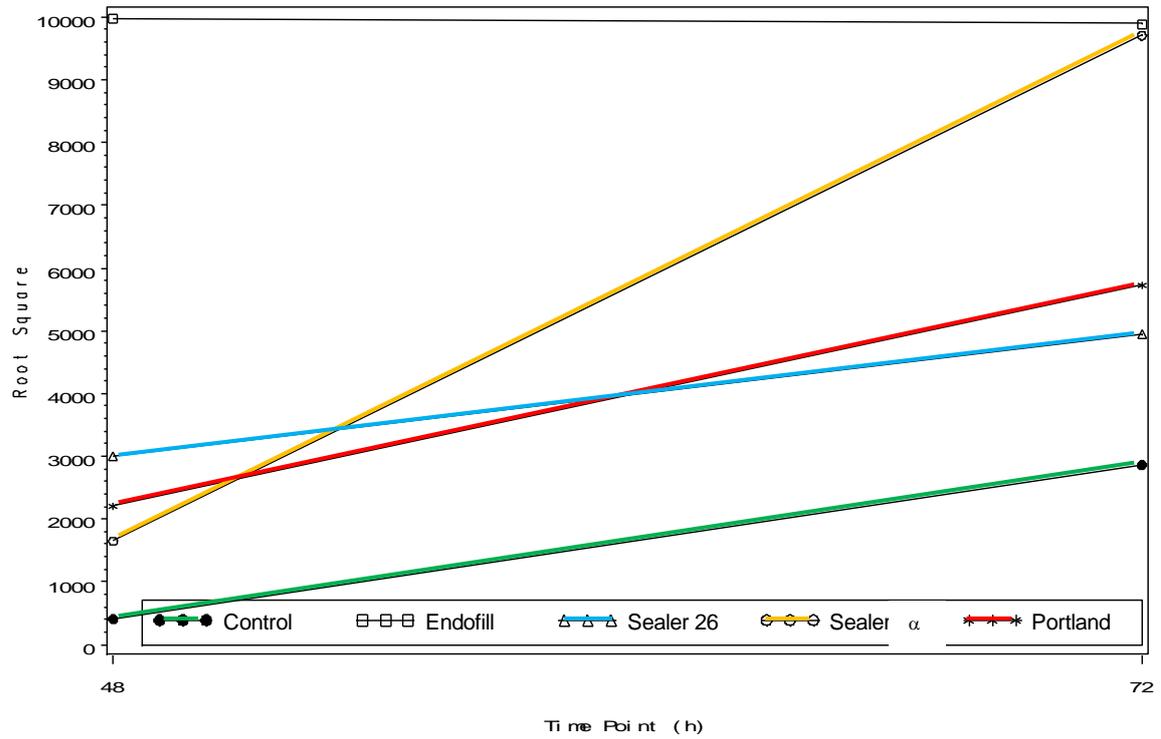


Figura 1: Efeitos dos materiais endodônticos avaliados no conteúdo DNA celular. (Fresh material = Momento I; Set material = Momento II)

A



B

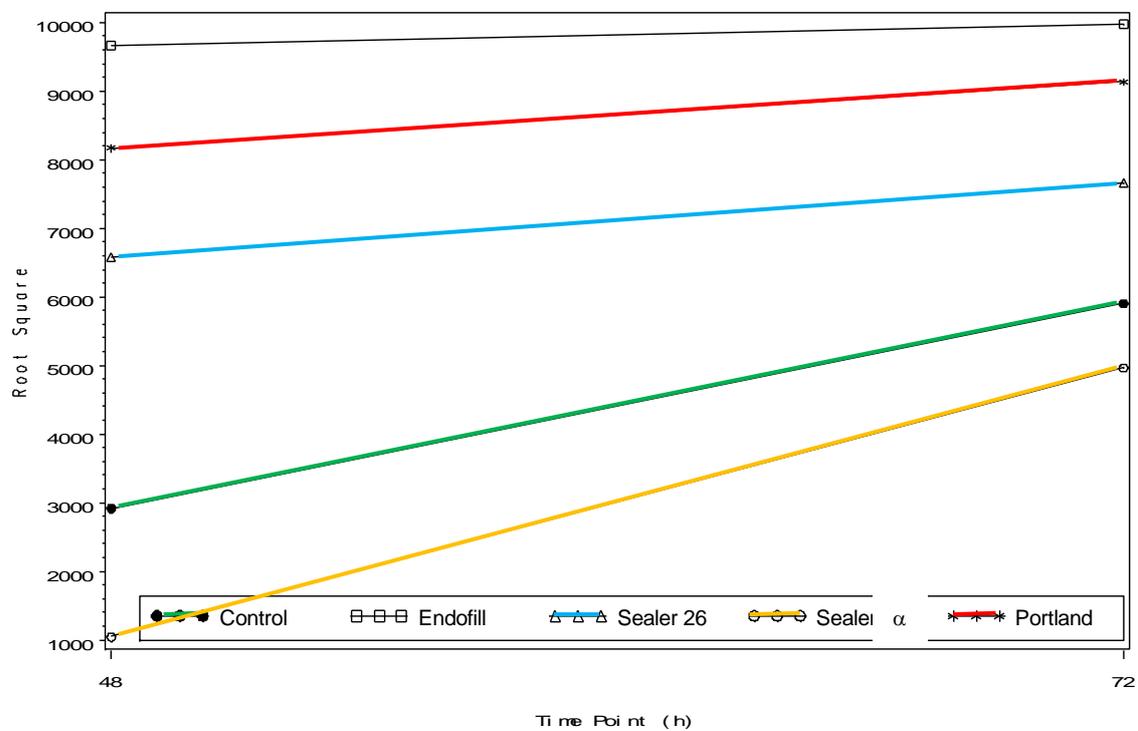


Figura 2: Fragmentação de DNA nas células do ligamento periodontal. O gráfico A representa o material no Momento I e o gráfico B o Momento II.

3.5.2 Ciclo celular

Na análise do ciclo celular (Tabela 2) observou-se que também houve interação tripla, ou seja, as diferenças são decorrentes das interações entre os três fatores (tempo, material e estado de presa).

Na fase G1, com material ainda fresco (48 h), apenas o Endofill apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$). No Momento II apenas o Sealer α não apresenta diferença significativa em relação ao controle, em ambos os períodos analisados ($p > 0,05$) (Figura 3 e 4).

Tabela 2: Alterações no ciclo celular das células do ligamento periodontal humano após contato com extrato de materiais endodônticos*

Momento I						
Material	G1		S		G2/M	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Controle	70.5063131	67.4641832	48.8999968	36.1424235	42.7467997	33.0771298
Endofill	3.2724459	8.2578908	2.1842309	2.9213721	0.9106836	3.4773577
Sealer 26	72.5168561	60.0117389	27.1043493	30.5777062	30.4872702	18.8858144
Sealer α	86.3509273	9.1241589	14.8125711	8.4527793	25.6479931	1.3333333
CP**	76.6253541	51.3802689	27.8926053	26.9394404	29.5336360	28.7598999
Momento II						
Material	G1		S		G2/M	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Controle	84.1431336	63.8421667	34.1748665	20.7468566	34.3708217	18.3066798
Endofill	8.7354043	4.1143990	4.0832271	1.8652514	2.2954498	1.2167605
Sealer 26	58.3716375	48.3711889	19.9299832	16.1653359	23.5795688	4.0986557
Sealer α	81.8348213	57.5466653	24.8963056	15.3996267	32.9124519	13.7423574
CP**	42.7490358	27.1580547	25.7257009	10.2902560	18.2467736	2.8671799

* Raiz quadrada da média de alteração do ciclo celular

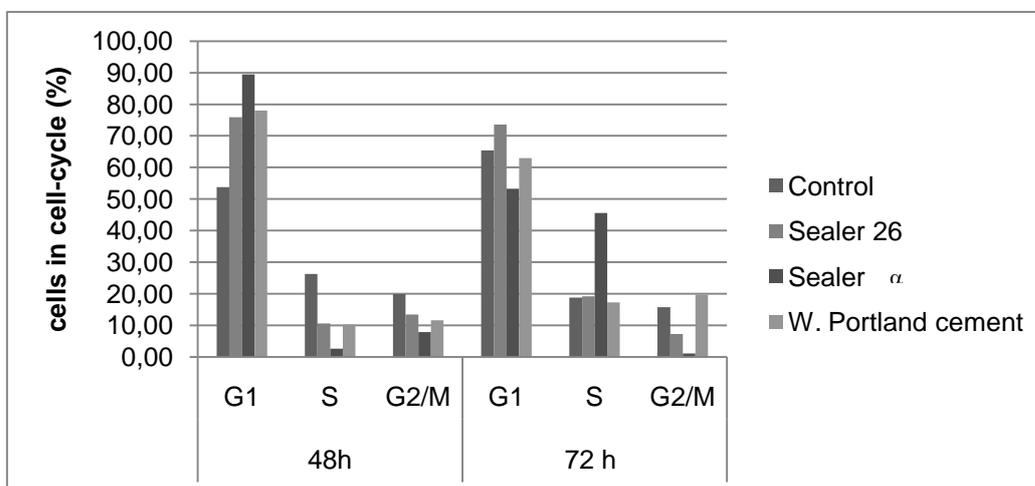
** Cimento de Portland

Na fase S, do ciclo celular, as diferenças entre controle e materiais foram devidas às interações entre dois fatores (grupo x tempo ou grupo x estado de presa

ou estado de presa x tempo). Todos os materiais diferiram do controle quando frescos no período de 48 h ($p < 0,0001$). Após esse período, o Sealer 26 e o Cimento de Portland apresentaram similaridade com o controle ($p > 0,05$). No Momento II, apenas o Sealer α e o Cimento de Portland não apresentaram diferenças com o controle (Figuras 3 e 4).

Finalmente, na fase G2/M repete-se a situação da fase G1 em que houve interação tripla entre os fatores ($p < 0,0001$), no Momento I. No Momento II, o Sealer α foi o único que não diferiu do controle nos períodos observados ($p > 0,05$).

A



B

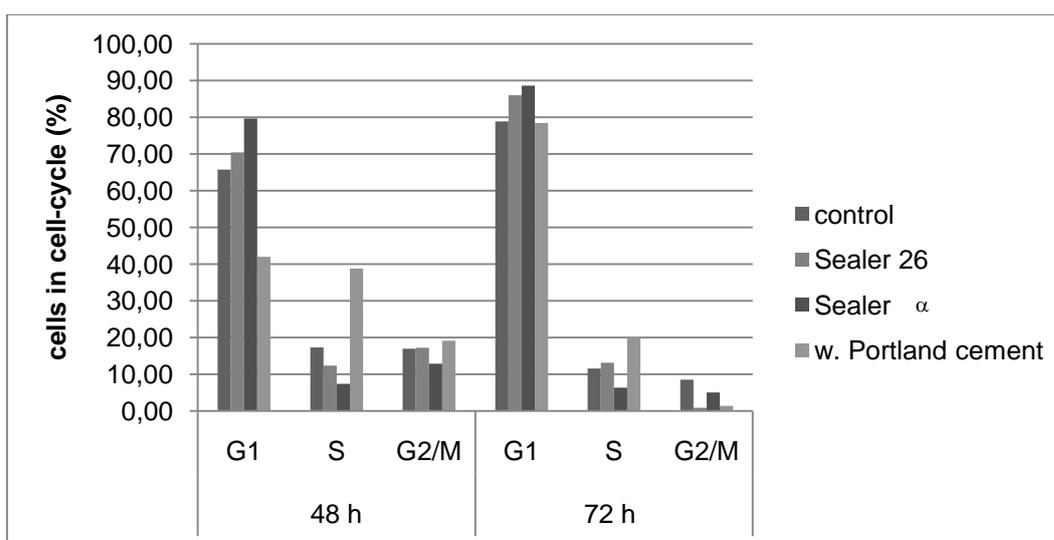
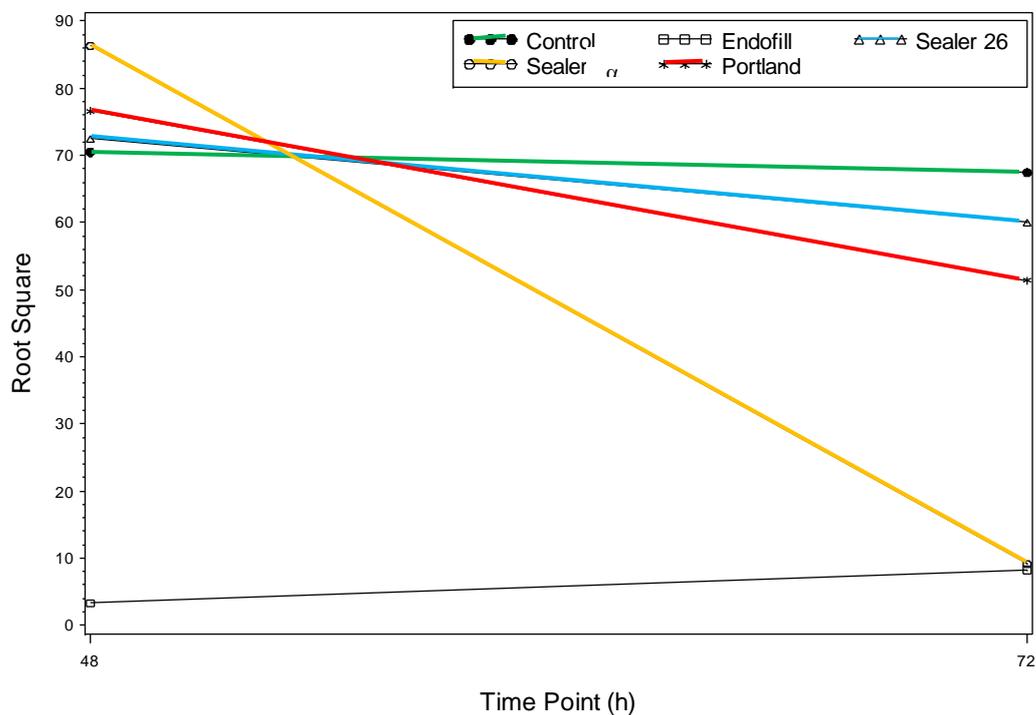


Figura 3: Efeito dos materiais endodônticos sobre o ciclo celular. Gráfico A representa o Momento I e Gráfico B o Momento II. O Endofill não foi representado porque provocou excessiva destruição celular

Fase G1

A



B

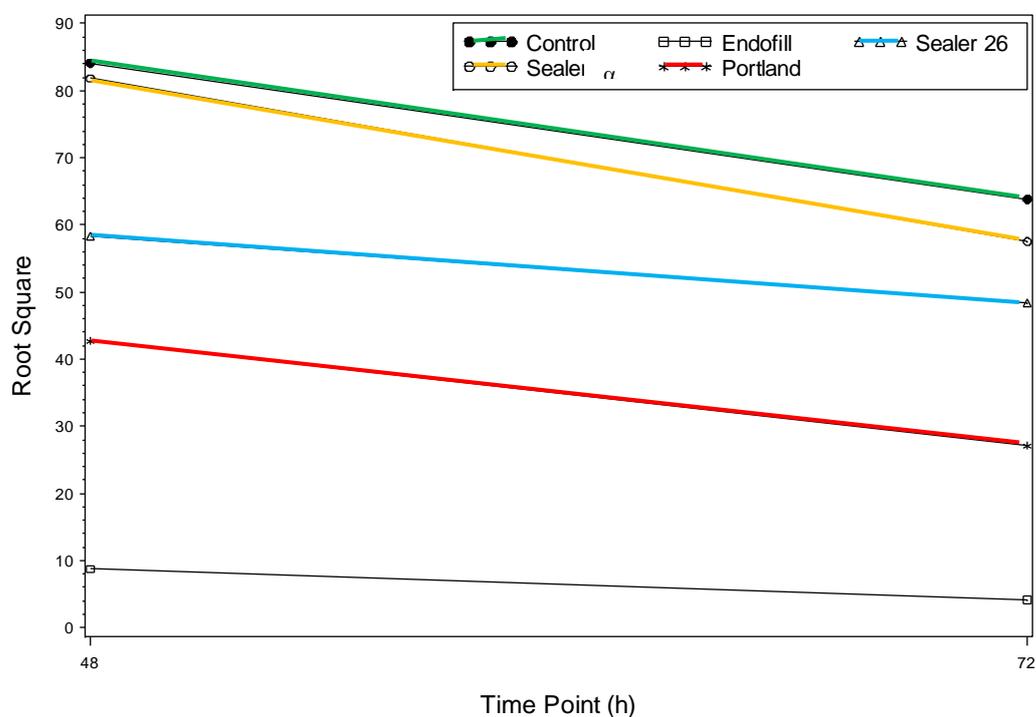
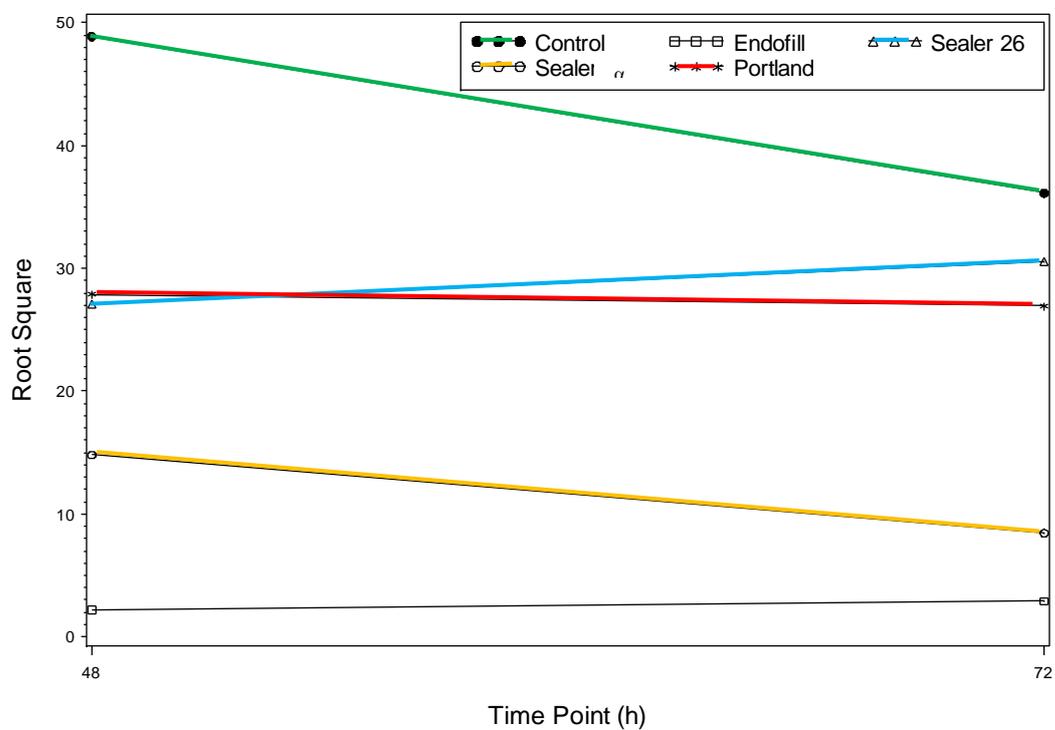


Figura 4: Alterações no ciclo celular nas células do ligamento periodontal após contato com extratos dos materiais endodônticos. Cada linha representa uma fase do ciclo, na ordem G1, S e G2/M. Os gráficos A, C e E representam o material no Momento I (fresco) e os gráficos B, D e F representam o material no Momento II.

Fase S

C



D

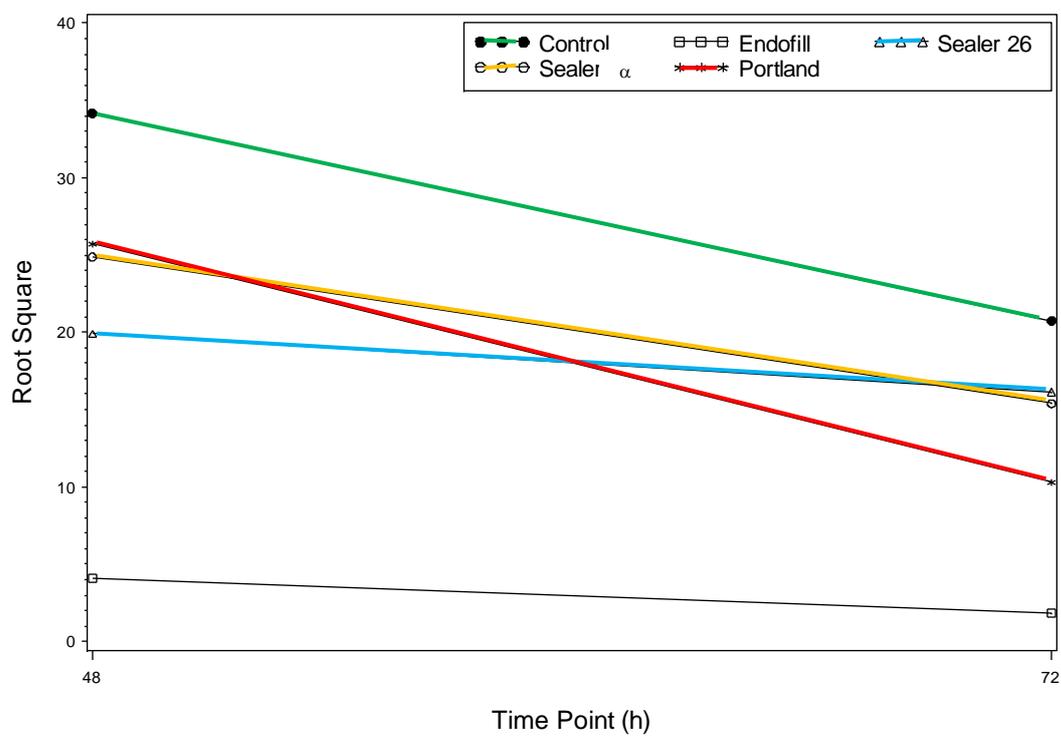
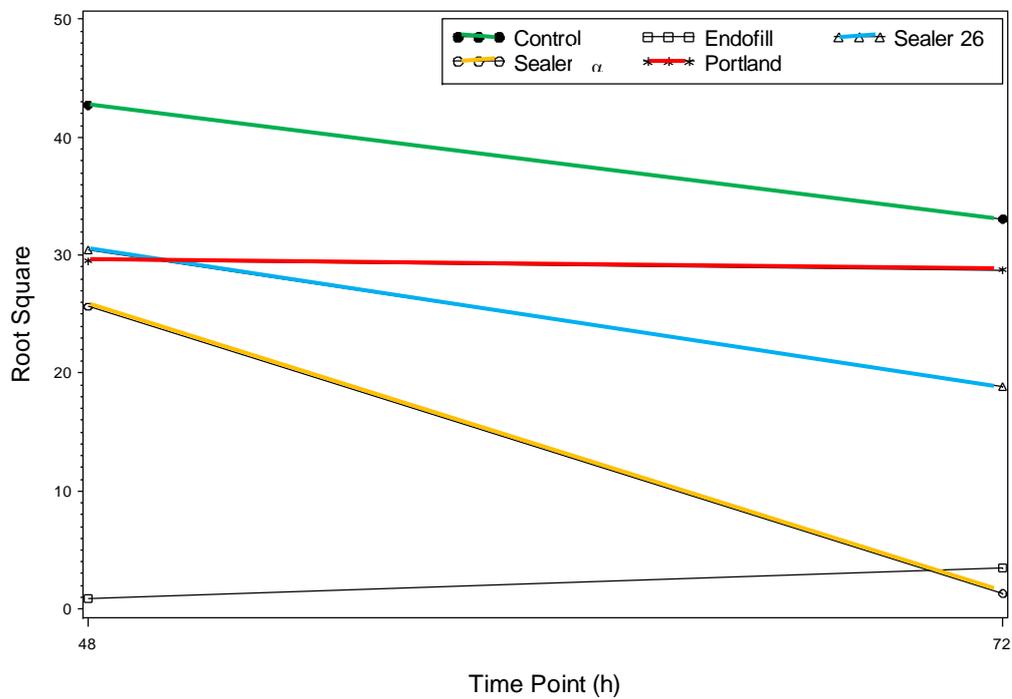


Figura 4: continuação

Fase G2/M

E



F

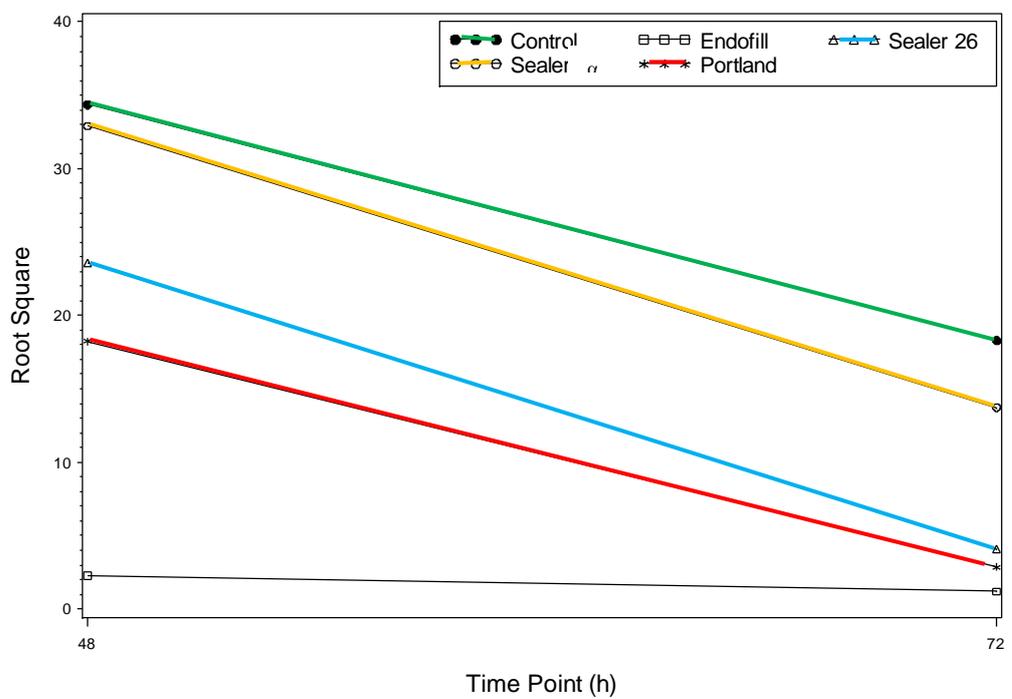


Figura 4: continuação

3.6 Discussão

O ligamento periodontal possui células de diversas populações em estágios de diferenciação e linhagens, logo cada grupo de células possui condições favoráveis de crescimento (23). Em geral, o número de células geradas no processo de proliferação é igual ao número daquelas que foram perdidas por morte ou por migração (3). A preferência pela utilização de cultura primária foi para aproximar os resultados *in vitro* dos observado *in vivo*, apesar do conhecimento das inúmeras limitações relativas a esta aproximação.

A apoptose pode ser desencadeada por diversos mecanismos tais como ligação a citocinas específicas (TNF) ou pela alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial externa com liberação do citocromo c e outros fatores apoptogênicos (24, 25). Outros fatores relacionados com a mitocôndria são a hiperpolarização da membrana interna e o colapso do potencial de membrana (26).

No presente estudo verificou-se que todos os materiais são citotóxicos, pois todos provocaram fragmentação do DNA das células e alterações no ciclo celular (Figura 2 e 4). Contrariamente à literatura, o Cimento de Portland também demonstrou genotoxicidade (Figura 2).

Uma das prováveis causas da genotoxicidade do Sealer 26 é a resina epóxi (27, 28). O bisfenol-A e subprodutos diminuem a adesão de macrófagos, mas não reduz a sua viabilidade (29). Outros autores atribuem à toxicidade dos materiais endodônticos resinosos à liberação de formaldeído a partir do hexametileno tetramina (30-32).

Contudo, tal afirmação torna-se discutível uma vez que o Sealer α possui tanto a resina quanto o catalisador do Sealer 26, mas apresentou resultados diversos (Figuras 1 e 2). O Sealer α apresentou os melhores resultados em relação a fragmentação do DNA. Enquanto fresco mostrou-se tóxico apenas no período de 48 h (Figura 1). Contudo, após a presa, os resultados sugerem que o Sealer α possui um efeito protetor, pois apresentou 64,2% menos dano às células do que o controle (Tabela 1). Mais estudos para análise da sua toxicidade se fazem necessários para determinar o agente causador desta toxicidade.

Os materiais à base de óxido de zinco-eugenol são os mais tóxicos (Figura 1) e mantiveram uma regularidade nos resultados, ou seja, se mostraram tóxicos em

todos os períodos avaliados. Esses resultados corroboram os encontrados por Granchi e colaboradores (1995)(27).

É importante ressaltar que os testes de genotoxicidade nem sempre refletem carcinogenicidade, uma vez que a geração de tumores depende de fatores indutores de dano no DNA e de fatores que gerem metabólitos reativos, sua distribuição e seus efeitos na proliferação celular (16). Daí a necessidade de se realizar uma série de testes.

A análise do DNA por citometria de fluxo utilizando solução de iodeto de propídeo como fluorocromo revela uma sub-população de células com reduzida estabilidade no DNA. Essa redução é consequência da progressiva perda de DNA (10). A apoptose pode até ser suprimida em resposta a baixos níveis de dano ou durante o arresto das fases permitindo o reparo do DNA e prevenindo a destruição desnecessária da célula (12).

Neste estudo verificou-se que os materiais que provocaram os maiores danos ao DNA também causaram inibição do crescimento celular. Essa atividade antiproliferativa foi observada pela diminuição da contagem de células nas fases S/G2/M e acúmulo de células na fase G1 quando comparadas com o controle no período de 48 h, Momento I (12, 33)

Danos no DNA podem interromper o ciclo celular (13). O equilíbrio entre as fases mitóticas e a morte celular mantém a proliferação celular (12). Neste estudo demonstrou-se que todos os materiais causam alterações no ciclo celular (Figura 3 e 4). Além disso, demonstrou-se que a toxicidade não é restrita ao período que o material está fresco, uma vez que o mesmo apresentou toxicidade após a presa. Isso sugere que apesar de endurecidos, os materiais continuam liberando substâncias tóxicas que podem afetar o ciclo celular (28, 34). O possível mecanismo apoptótico inclui o aumento da concentração do cálcio citosólico e a via do ácido nítrico (35). As implicações clínicas para alterações no ciclo celular são a diminuição e o retardo do processo de reparo.

3.7 Conclusões

O novo cimento à base de óxidos bioativos causou menores danos ao DNA e ao ciclo celular, principalmente após a presa.

3.8 Referências

1. Grzseik W, Narayanan A. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.
2. Bartold P, Xiao Y, Lyngstaadas P, Paine M, Snead M. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2006;41:123-35.
3. Pitaru S, McCulloch C, Narayanan A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research*. 1994;29:81-94.
4. Macneil R, Somerman M. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *Journal of Periodontal Research*. 1993;28:550-9.
5. Ababneh K, Hall R, Embery G. Immunolocalization of glycosaminoglycans in ageing healthy and periodontally diseased human cementum. *Arch Oral Biol*. 1998;43:235-46.
6. Macneil R, D'errico J, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman M. Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? *Eur J Oral Sci*. 1998;106(suppl 1):368-75.
7. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues cementogenesis revisited. *Periodontology 2000*. 2006;41:196-217.
8. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam M, Suzuki R. The initial attachment of cemental fibrils to the root dentin surface in acellular and cellular cementogenesis in rat molars. *Ann Anat*. 2001;183(2):123-8.
9. Macneil R, Somerman M. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000*. 1999;19:8-20.
10. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death. *Journal of Immunological Methods*. 2000;243:167-90.
11. Kao S-Y, Lemoine F, Marriott S. p53-independent induction of apoptosis by the HTLV-1 tax protein following UV irradiation. *Virology*. 2001;291:292-8.
12. Clarke P, Allan L. Cell-cycle control in the face of damage - a matter of life or death. *Trends in cell biology*. 2009;19(3):89-98.
13. Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66:1039-56.
14. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide and two Portland Cement. *International Endodontic Journal*. 2006;39:213-9.

15. Ribeiro D, Duarte M, Matsumoto M, Marques M, Salvadori D. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *Journal of Endodontics*. 2005;31(8):605-7.
16. Braz M, Camargo E, Salvadori D, Marques M, Ribeiro D. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2006;33:234-9.
17. Hume W. The pharmacological and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *The Journal of the American Dental Association*. 1984;113:789-91.
18. Kostoryz EL, Tong P, Chappelow C, Eick J, Glaros A, Yourtee D. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999;15:363-73.
19. Huang T-S, Ding S-J, Hsu T-C, Kao C-T. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials*. 2003;24:3909-13.
20. Hing KA. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2005;2(3):184-99.
21. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;44(4):389-96.
22. Lee K-W, Williams M, Camps J, Pashley D. Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. *Journal of Endodontics*. 2002;28:684-8.
23. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*. 2006;41(303-310):303.
24. Kluck R, Esposti M, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, et al. The apoptotic proteins, bid and bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *The Journal of Cell Biology*. 1999;147(4):809-22.
25. Igney F, Krammer P. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:277-88.
26. Green D, Reed J. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
27. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblast. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 1995;79:359-66.
28. Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y, Chang Y-C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*. 2002;35:153-8.

29. Segura J, Rubio A, Pulgar R, Olea N, Guerrero J, Calvo J. In vitro effect of the resin component bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod.* 1999;25(5):341-4.
30. Spangberg L, Barbosa S, Lavigne G. AH26 releases formaldehyde. *J Endod.* 1993;19(12):596-8.
31. Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy-resin-based root canal sealer AHplus. *J Endod.* 1999;25(2):109-13.
32. Jukic S, Miletic I, Anic I, Britvic S, Osmak M, Sistig S. The mutagenic potencial of AH+ and AH26 by salmonella/microsome assay. *J Endod.* 2000;26(6):321-4.
33. Valois CRA, Azevedo RB. Cell-cycle deregulation induced by three different root canal sealers in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics.* 2008;106:763-7.
34. Barbosa S, Araki S, Spangberg L. Cytotoxicity of some modified root canals sealers and their leachable components. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics.* 1993;75:357-61.
35. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblast. *Journal of Endodontics.* 2007;33(12):1450-4.

Discussão Geral

Do momento que ocorre a perfuração radicular até o completo reparo, os profissionais dependem da combinação de vários fatores, como material utilizado (propriedades físico-químicas) e características biológicas da região a ser trabalhada.

O ligamento periodontal, responsável pelo processo de reparo biológico das perfurações, constitui-se de fibras e diversos tipos celulares (1). Em geral, o número de células geradas no processo de proliferação é igual ao número de células perdidas por morte ou por migração (2).

A matriz dentinária induz, no processo de reparo, a formação de um tecido tipo-cimento celular (3). Já a matriz cementária influencia na diferenciação de células mesenquimais e induzem fatores de adesão e regeneração periodontais (2).

A matriz cementária é formada por proteínas colágenas e não-colágenas. As primeiras são responsáveis pelas propriedades de suporte do dente (4) além de auxiliar na deposição mineral (5). As proteínas não-colágenas auxiliam nos processos de ligação célula-matriz (5-9) e regulam a migração, a diferenciação e a participação das células em processos inflamatórios (5, 8).

Na ausência dessa estrutura, devido a uma perfuração radicular, por exemplo, o material endodôntico utilizado no selamento deverá cumprir tais funções. Daí a necessidade do desenvolvimento de materiais bioativos.

A biocompatibilidade de um material pode ser ótima se o material estimular a formação de um tecido normal na superfície e estabelecer uma interface contínua, capaz de suportar a carga tensional do local (10). No geral, as células se adaptam ao material. Algumas adaptações são a atrofia (diminuição do tamanho ou função celular), a hipertrofia (aumento do tamanho celular), hiperplasia (aumento do número de células) e a metaplasia (mudança no tipo celular) (11).

Dessa forma, o conhecimento do comportamento celular frente aos materiais utilizados no reparo é o primeiro passo no desenvolvimento de biomateriais. Cada tipo celular responde de uma maneira distinta aos estímulos do meio. Geralmente,

as células do ligamento periodontal humano são mais sensíveis que as células V79 (fibroblasto de pulmão de hamster chinês) e células L-929 (fibroblastos de pele de rato) aos testes de citotoxicidade (12, 13) ou às alterações no pH e na concentração de cálcio do meio extracelular em comparação com células HEDL (fibroblasto humano de pulmão embrionário) (14).

Neste estudo foi dada preferência às células do ligamento periodontal humano para poder aproximar os resultados da situação *in vivo*. Contudo, há dificuldade na comparação entre os trabalhos porque poucos são os que utilizam tais células.

A necessidade do conhecimento do comportamento fisio-patológico das células é tão importante, que até o processo de apoptose, da maneira clássica como é descrita, não ocorre em todas as células do organismo (15). Em alguns casos, a membrana plasmática é preservada, mas a degradação do DNA é realizada de maneira aleatória, sem a evidência de clivagem. Em outras situações, a degradação do DNA é típica da apoptose, mas a fragmentação nuclear e outros fatores do processo não são aparentes. E é por esse motivo que a literatura relata ao menos 11 formas distintas da célula morrer (16).

Em relação aos materiais endodônticos, cada material apresenta uma composição diferente e cada componente uma função específica para o selamento, o controle de microrganismo, a adesão e o reparo. Nesse estudo, observou-se que a composição foi o fator que mais influenciou na compatibilidade do material.

O cimento à base de óxido de zinco-eugenol é um dos mais antigos dentro da Odontologia (17). Vários estudos já foram realizados na avaliação da toxicidade do cimento (18-20). O eugenol é um derivado fenólico que possui a capacidade de inibir o crescimento e proliferação de células U2OS (células de sarcoma osteogênico humano) (19), inibir a síntese de IL-1 β e IL-6 e o crescimento de células L929 (fibroblastos de ratos) e RAW 264.7 (macrófagos de ratos) (21), além de alterar a permeabilidade das membranas celulares (18). Devido ao seu grande potencial tóxico, o mesmo foi utilizado neste trabalho como controle positivo.

Sobre células periodontais verificou-se que este material inibe a proliferação e a viabilidade mitocondrial (artigo 1), altera a morfologia celular (artigo 2) e degrada o DNA celular inibindo o ciclo celular (artigo 3).

As resinas epóxi foram muito estudadas com o surgimento do cimento AH 26. São inertes após a polimerização (22) e possuem adesão à estrutura dentária (23). Entretanto, antes da polimerização apresentam um potencial tóxico elevado (12, 24-26), apesar da baixa solubilidade da resina (27).

Contudo após a presa mantém a toxicidade por diminuírem o potencial de membrana mitocondrial (artigo 1). Essa redução acarreta em perda da capacidade de geração de energia. Isso pode ser corroborado pelas alterações morfológicas e volumétricas das células periodontais em contato com extrato de Sealer 26 (artigo 2).

O MTA é formado por um pó de partículas hidrofílicas que ao ser misturado com água transforma-se em um cimento rígido. Os principais componentes do pó são: silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e o óxido silicato, além de pequenas quantidades de outros óxidos minerais que são responsáveis pelas propriedades físicas e químicas do cimento (28). Apresenta pH inicial em torno de 10,2 podendo aumentar para 12,5 após três horas (28). Em análise estrutural, o cimento de Portland apresenta o dobro da quantidade de gipsita, uma maior quantidade de metais pesados e uma menor quantidade de bismuto (29)

Pela alta concentração de cálcio na composição, o mesmo se torna solúvel e é liberado para o meio facilitando o processo de formação de cristais de hidroxiapatita (30, 31). Essa grande liberação de cálcio também é responsável pela necrose de coagulação e calcificação distrófica que ocorre após implantes subcutâneos (32, 33). Além do cálcio, tanto o MTA quanto o cimento de Portland liberam arsênico a partir do limestone (29, 34).

Cada um destes materiais pode provocar reações diferentes nas células, causando uma redução do seu metabolismo ou morte, por necrose ou apoptose. Apesar dessa variabilidade de mortes celulares, uma característica comum às células no processo é a alteração volumétrica. Contudo, a diminuição do volume celular não significa uma situação irreversível de viabilidade. Quando células não-

linfóides são expostas às condições hipertônicas há diminuição do volume seguido de uma resposta para aumentar o mesmo, sem que haja ativação do processo de morte (35).

Dos materiais analisados nestes estudos três apresentam a capacidade de liberação de íons e alteração do pH do meio: Sealer 26, Sealer α e cimento de Portland branco. O principal íon liberado é o cálcio. O aumento da concentração extracelular de cálcio pode, em alguns tipos celulares, induzir o aumento da concentração intracelular (36). Esse aumento interno da concentração de cálcio pode ativar mecanismos que diminuam o volume celular (37). À medida que a concentração aumenta ocorre uma gradativa perda de função celular, sendo que somente 25% das células permanecem viáveis em uma concentração de cálcio de 20 mM (14).

Além da perda de viabilidade pela concentração de cálcio, as alterações no pH também provocam alterações morfológicas (14, 38). Em pH alcalino pode ocorrer desnaturação protéica, peroxidação lipídica e danos ao DNA celular (39, 40). Também estão relacionadas com a modificação de etapas do processo de morte, mas essas conclusões são célula-dependentes (41).

Danos ao DNA da célula podem ativar o processo de apoptose a partir da inibição da síntese de RNA (42). Contudo o processo de apoptose pode ser suprimido em respostas a danos de baixa intensidade e que permitam o reparo do DNA. Dessa forma, ao invés de uma destruição celular desnecessária pode ocorrer arresto do ciclo celular para que haja a reparação (43). Talvez esta seja a razão das células em contato com extrato do cimento de Portland apresentarem uma fragmentação de DNA maior que os demais cimentos contendo hidróxido de cálcio, mas manter sem grandes alterações outros aspectos analisados.

Arresto no ciclo celular é atribuído a um mecanismo de acúmulo de danos, que é induzido por numerosos fatores biológicos e bioquímicos estressores, quer intrínsecos, quer extrínsecos, que geram redução na população celular, sem danos na membrana plasmática (44).

Esse arresto no ciclo também pode ser sugerido pelo teste MTT, no qual já foi verificado que materiais que causam arresto na fase G2/M, sem necessariamente

causar apoptose na célula, apresentam uma atividade redutora de MTT maior do que as células que estão em atividade mitótica (45). O teste MTT é um teste útil na avaliação da proliferação celular (46), contudo para avaliação de viabilidade pode sofrer interferências por artefatos metabólicos criando falso-positivos ou –negativos (47). Já a citometria de fluxo baseia-se na contagem direta de células, tanto cultura homogênea quanto heterogênea, sem sofrer influência do estado metabólico da célula. Dessa forma, o número de células detectadas é proporcional à concentração de células da amostra e não ao seu estado metabólico (48).

É importante salientar que as perdas de volume, o efluxo de potássio e as mudanças no potencial de membrana mitocondrial podem ocorrer independentes da fragmentação de DNA e de maneira dependente ou independente da ativação de caspases (49). Talvez essa seja a razão do Sealer α apresentar resultados baixos no volume celular, mas com preservação do DNA e do potencial de membrana mitocondrial.

O ponto que ocorre irreversibilidade do processo é incerto e somente um estudo de microscopia poderia fornecer as informações corretas por continuar sendo o padrão-ouro para análise celular (50)

O novo material desenvolvido pela Universidade de Brasília demonstrou possuir propriedades desejáveis para ser utilizado como material reparador. Os baixos resultados nos testes de morfologia e MTT não são condenatórios, uma vez que este material apresentou uma peculiaridade em relação aos demais. Qualquer que fosse o período de observação, quando o material estava fresco, embora sendo filtrado, após a incubação por 24 horas com as células, formava-se sobre as mesmas uma espécie de gel. Na composição do Sealer α o CaO e o P₂O₅ foram adicionados para garantir uma concentração de cálcio e fósforo na superfície que fosse suficiente para induzir a deposição de cálcio e fósforo orgânicos e iniciar o processo de calcificação. Já a sílica é necessária para garantir a adesão ao colágeno (51). Biocerâmicas que possuem sílica na composição, geralmente, promovem a formação de uma camada de sílica-gel na superfície do material, independente do meio (51, 52). No entanto, na presença de soro, ocorre uma redução da liberação de cálcio e aumento da camada de gel de sílica com adsorção das proteínas do soro (52).

Como o Sealer α foi o único a reagir como o meio. Considerando que alterações no meio celular podem induzir uma variedade de eventos celulares incluindo arresto, controle de apoptose e necrose descontrolada (44), até que ponto esta reação foi responsável pelos resultados negativos?

Perspectivas Futuras

Do ponto de vista biológico, as reações ao implante de materiais são bem diferentes. Todos os cimentos comercializados (Sealer 26, Endofill e cimento de Portland) ao serem implantados em tecidos provocam intensas reações inflamatórias e áreas de necrose (53-55).

Tais diferenças entre as respostas das células, na pesquisa *in vitro* quanto na pesquisa *in vivo*, ocorrem não só pelo modelo adotado, mas por condições do meio. Há que se considerar que na pesquisa com células procura-se criar um meio com condições ideais de crescimento (nutrição, temperatura, pH). Já na pesquisa *in vivo* a relação entre os diversos tecidos, bem como a própria resposta inflamatória com seus mediadores químicos, alteram a resposta celular.

Desta forma, assim como se faz mister conhecer o comportamento celular em nível mais profundo, é importante ter a noção dessa interferência dos mediadores químicos, citocinas e outras substâncias, na reação aos materiais.

Em relação à pesquisa com células, o ideal seria trabalhar com células de ligamento periodontal humano, mas por questões éticas pode ser um complicador. Assim a escolha da célula deve ser o mais próximo possível da filogenética das células do ligamento periodontal.

A utilização de protocolos imunocitoquímicos pode auxiliar na identificação de canais de membrana, bem como dos intermediários apoptóticos que são bloqueados ou estimulados após o contato com os materiais. Dessa forma, pode-se aliar esse conhecimento na busca de materiais que liberem substâncias potencializadoras da resposta desejada por agirem especificamente sobre uma parte da célula. Ou seja, a cada pesquisa fica mais clara a necessidade do desenvolvimento de materiais bioativos que auxiliem no reparo, não apenas como meros seladores, mas como agentes ativos do processo.

Apesar dos avanços desse tipo de pesquisa, a microscopia permanece como padrão-ouro na avaliação de fragmentação celular e nuclear. Mas, o potencial tóxico do material e o custo podem ser complicadores desse modelo.

Conclusões Finais

Com base nos resultados conclui-se que:

1. Todos os materiais avaliados são citotóxicos para as células do ligamento periodontal humano, principalmente quando frescos, na medida em que:
 - a. Todos os materiais provocaram diminuição na taxa de proliferação das células pelo teste MTT. A diminuição foi menor em contato com o Cimento de Portland.
 - b. Sealer α e cimento de Portland branco não alteraram o $\Delta\Psi_m$ como os demais cimentos. A manutenção do potencial viabiliza as funções celulares e a estabilidade da membrana plasmática.
 - c. Após o contato com extrato dos cimentos Sealer 26, Sealer α e Endofill, as células do ligamento periodontal tendem a reduzir de volume.
 - d. Sealer α foi o material que causou o menor dano ao DNA celular.
 - e. Todos os materiais provocaram alterações no ciclo celular, contudo essa variação foi menor nas células que ficaram em contato com extrato do Sealer α .
2. A toxicidade dos materiais tende a diminuir à medida que a reação de presa se completa.

Referências

1. Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Takahashi I, Suzuki O, Sasano Y. Proliferation and adhesion of periodontal ligament cells on synthetic biominerals. *Oral Diseases*. 2007;13:500-6.
2. Pitaru S, McCulloch C, Narayanan A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research*. 1994;29:81-94.
3. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam M, Suzuki R. The initial attachment of cemental fibrils to the root dentin surface in acellular and cellular cementogenesis in rat molars. *Ann Anat*. 2001;183(2):123-8.
4. Selvig K. The fine structure of human cementum. *Acta Odont Scand*. 1965;23:423-41.
5. Grzesik W, Narayanan A. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.
6. Macneil R, Somerman M. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *Journal of Periodontal Research*. 1993;28:550-9.
7. Macneil R, D'errico J, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman M. Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? *Eur J Oral Sci*. 1998;106(suppl 1):368-75.
8. Saygin N, Giannobile W, Somerman M. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*. 2000;24:73-98.
9. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *The Anatomical Record*. 1996;245(2):267-92.
10. Ducheyne P. Bioceramics: material characteristics versus in vivo behavior. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(A2):219-36.
11. Anderson J, Gristina A, Hanson S, Harker L, Johnson R, Merrit K, et al. Host Reaction to biomaterials and their evaluation. In: Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J, editors. *Biomaterial science An Introduction to materials in Medicine*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 484.
12. Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y, Chang Y-C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*. 2002;35:153-8.

13. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg L. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95:483-9.
14. Lengheden A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts in vitro. *Scand J Dent Res.* 1994;102:130-6.
15. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997;27:1-20.
16. Melino G, Knight R, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ.* 2005;12:1457-62.
17. Camps J, Pommel L, Bukiet F, About I. Influence of the powder/liquid ratio on the properties of zinc oxide-eugenol-based root canal sealers. *Dent Mater.* 2004;20:915-23.
18. Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials.* 2001;22:1459-66.
19. Ho Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J.* 2006;39:389-93.
20. Hume W. Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, and liver cells in vitro. *J Dent Res.* 1984;63(11):1262-5.
21. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi K, Spangberg L, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95:739-45.
22. Allen G, JC B. *Comprehensive polymer science - the synthesis, characterization, reactions and applications of polymers.* Oxford: Pergamon; 1989.
23. Azar N, Heidari M, Bahrami Z, Shokri F. In Vitro Cytotoxicity of a New Epoxy Resin Root Canal Sealer *J Endod.* 2000;26(8):462-5.
24. Huang T-H, Lee H, Kao C-T. Evaluation of genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based, and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endod.* 2001;27(12):744-8.
25. Miletic I, Jukic S, Anic I, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Osmak M. examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AHplus sealers. *Int Endod J.* 2003;36:330-5.
26. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblast. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 1995;79:359-66.

27. Kostoryz EL, Tong P, Chappelow C, Eick J, Glaros A, Yourtee D. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials*. 1999;15:363-73.
28. Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Pitt Ford T. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995;21(7):349-53.
29. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide and two Portland Cement. *International Endodontic Journal*. 2006;39:213-9.
30. Holland R, Otoboni J, Filho, Souza V, Nery M, Bernabé P, Dezan E, Jr. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod*. 2001;27(4):281-4.
31. Sarkar N, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2005;31(2):97-100.
32. Moretton T, Brown CJ, Legan J, Kafrawy A. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:528-33.
33. Camilleri J, Pitt Ford T. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006;39:747-54.
34. Bramante C, Demarchi A, Moraes I, Bernadineli N, Garcia R, Spangberg L. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2008;106:909-13.
35. Bortner C, Cidlowski J. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:1549-59.
36. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;532.1:3-16.
37. Lang F, Busch G, Ritter M, Volk H, Waldegger S, Gulbins E, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 1998;78:247-306.
38. Lengheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts in vitro. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:148-55.
39. Estrela C, Holland R. Hidróxido de cálcio. In: Estrela C, editor. *Ciência Endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p. 457-538.
40. Carneiro D, Barbosa S. Avaliação do pH dos cimentos endodônticos e considerações clínicas. *Robrac*. 1998;7(24):6-10.
41. Cutaia M, Black A, Cohen I, Cassai N, Shidu G. Alkaline stress-induced apoptosis in human pulmonary artery endothelial cells. *Apoptosis*. 2005;10:1457-67.

42. Franco R, Sánchez-O R, Reyes-Reyes E, Panayiotidis M. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à trois. *Mutation Research*. 2009;674:3-22.
43. Clarke P, Allan L. Cell-cycle control in the face of damage - a matter of life or death. *Trends in cell biology*. 2009;19(3):89-98.
44. Kim H, Yoon S, Lee T, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology Letters*. 2009;184:13-7.
45. Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolaro R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters*. 2003;195:193-9.
46. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
47. Pozzolini M, Scarfi S, Benatti U, Giovine M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical Biochemistry*. 2003;313:338-41.
48. Wang Y-Y, Zheng X-X. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. *Journal of Immunological Methods*. 2002;268:179-88.
49. Bortner C, Cidlowski J. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21953-62.
50. Henery S, George T, Hall B, Baiji D, Ortyn W, Morissey P. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*. 2008;13:1054-63.
51. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487-510.
52. Radin S, Ducheyne P, Rothman B, et al. The effect of in vitro remodeling conditions on the surface reactions of bioactive glass. *J Biomed Mater Res*. 1997;37(3):363-75.
53. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *J Endod*. 2004;30(2):95-9.
54. Shahi S, Rahimi S, Lotfi L, Yavari H, Gaderian A. A Comparative Study of the Biocompatibility of Three Root-end Filling Materials in Rat Connective Tissue. *J Endod*. 2006;32:776-80.
55. Huang T-H, Ding S-J, Hsu T-C, Lee Z-D, Kao C-T. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci: Mater Med*. 2004;15:767-71.

Anexo 1

Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal
ligament fibroblasts

Enviado para Brazilian Oral Research

Aceito em 05/04/2010.

Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal ligament fibroblasts

Débora Ferreira Carneiro¹¹

Ana Cristina Barreto Bezerra¹²

¹¹ MS, Postgraduate researcher, University of Brasilia, Brasília, Brazil

¹² PhD, Associate Professor, School of Dentistry, Post-Graduate Program of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the cell viability of human periodontal ligament cells following contact with a new bioactive oxide-based endodontic material, as compared to commonly used endodontic materials, including zinc oxide-eugenol, epoxy resin-based sealers and white Portland cement. Toxicity of the materials was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), as measured by flow cytometry. Cells were incubated for 24-h with material extract prior to viability assessment. Values obtained in individual experimental series were compared using ANOVA with three factor interactions. Results determined that materials have some toxicity effect to human cells ($p < 0.05$). There was no correlation between the measure of viability by MTT assay and viability as measured by $\Delta\Psi_m$. These results suggest that the endodontic material may delay the repair process and that just a viability assay is not sufficient to determine the cytotoxicity to materials.

Keywords: Cell culture techniques; Cell viability; Flow cytometry; Periodontal ligament

Introduction

Root perforation is a pathological disease where space opens between periodontal tissue and pulp space. The most favorable prognosis results when the perforation is sealed immediately upon occurrence using a biocompatible repair material (1). Depending on the local environment, fibroblasts and mesenchymal cells derived from the periodontal ligament can differentiate into cementoblast-like cells (2), while maintaining cells populations at different stages of differentiation and lineage according to the local environment (3). Furthermore, a perforation has a complex morphological structure including dentin, cement and periodontal ligament (1).

There is no specific material for sealing a root perforation. Root canal sealers and mineral trioxide aggregate (MTA) are generally used at the apical and cervical region, respectively. Portland cement is similar to MTA, but includes a higher level of heavy metals (4). Many authors have reported the cytotoxicity of MTA and Portland cement (5). These substances may suppress the differentiation of osteoblast-like cells, but do not inhibit cell growth (6). These materials also have limited adhesion to dentin (7) beyond not be easy to handle. Depending on the environmental factors, like acidic pH, can occur changes at the physical properties of MTA during setting reaction (8).

Root canal sealers and their diffusible components may gain access to periodontal tissue through various pathways and induced adverse reactions (9-11) which may interfere with the healing process.

Bioactive materials have ability to perform with host response in a specific application, like induce newly hard tissue (12). Most are comprised of calcium and phosphorus, but some contain silica or magnesium (13). These chemical modifications may influence cellular behavior or the calcification process (14). At the University of Brasilia, a new bioactive oxide-based endodontic material was developed for use in root perforation or as root-end material. Epoxy resin was used as a vehicle and provided adhesion to dentin (10, 15).

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of a new bioactive oxide-based endodontic material in comparison to white Portland cement, epoxy-based and zinc oxide-based sealers on cultured human periodontal ligament (PDL) cells.

Materials and Methods

Cell culture of human periodontal cells

The cells for this study were obtained from the periodontal ligaments of two-third molar teeth from one individual (34 years old) undergoing complete bony impaction. This study was approved by the Ethical Committee of Faculty of Health Science at University of Brasilia. Immediately preceding the procedure, the patient was instructed to gargle for 2 minutes with 0.12% chlorhexidine solution (HUB, Brasília, DF, Brazil). The teeth were extracted and rinsed with saline solution (Segmenta, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). They were placed in a falcon tube with culture medium (*i.e.*, DMEM, with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 μ L streptomycin [Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, USA]). The tubes with teeth were taken to the morphological laboratory and, into a laminar flow chamber (Veco, Campinas, São Paulo, Brazil), the PDL tissues attached to the middle third of root were gently curetted and placed in 25-cm² tissue culture flasks with 5 mL culture medium, and were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil). When the cells surrounding the teeth were confluent, they were transferred to a 75-cm² tissue culture flask, and were designated first transfer cells. These cells were used for the study.

Treatment of cells

The materials tested are listed in Table 1. All sealers were commercially available, except for Sealer α . Materials were mixed according to the manufacturer's instructions. Sealer α has the same epoxy resin as Sealer 26 and was therefore mixed according to the manufacturer's instructions for Sealer 26. All of the sealers were mixed at once time in a laminar flow chamber and placed into the bottom of a 12-well in order to achieve a thickness of approximately 1 mm. For extraction medium, 3.4 mL DMEM was added on each sample. Extraction was executed in two conditions (fresh or set material, *i.e.*, after 24 h at 37°C in a humidified chamber), and divided into three independent time points (24, 48 or 72 h) in an atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. For each 24 h period, the culture medium from the extraction was transferred to a Falcon tube and new media was placed on the material. A control extraction was prepared in an identical manner, but there was not material added to the well.

Table 1: Sealers tested

Type	Product	Manufacturer	Composition
Bioactive oxide	Sealer α	University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil	Powder: oxide (CaO, SiO ₂ , P ₂ O ₅) 36% [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA], Hexamethylenetetramine 4% [Merck KGaA, Darmstadt, Germany], BaSO ₄ 60% [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA]. Liquid: bisphenol-A-diglycidylether 100%
Epoxy resin	Sealer 26	Dentsply, Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil	Powder: Bismuth(III)oxide, calcium hydroxide, hexamethylenetetramine, titanium dioxide. Liquid: bisphenol-A-diglycidylether (batch: 791827)
Zinc oxide-eugenol	Endofill	Dentsply, Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil	Powder: zinc oxide, hydrogenated resin, (BiO ₂) ₂ CO ₃ , BaSO ₄ , Na ₂ B ₄ O ₇ . Liquid: eugenol and oil of sweet almonds (batch: 792680)
White Portland Cement	Rejuntamento Flexível Quartzolit	Saint-Gobain Quartzolit, Jandira, São Paulo, Brazil	Powder: white Portland cement, inorganic pigments, nontoxic chemical additives. (Batch: not informed)

MTT assay

Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT assay) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). PDL cells (1×10^4 cell/well) were incubated with extraction material for 24 h at 37°C (3 replicates to each material and control). Each well received 150 μ L of MTT solution (15 μ L of MTT [5 mg/mL] and 135 μ L of culture medium). After a 3 h incubation, each well received 200 μ L DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and was mixed thoroughly to dissolve any insoluble blue formazan crystals. The plate was read on a micro-plate reader (Model 3550 V-BioRad, Berkeley, California, USA) using a reference wavelength of 595 nm.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

After extraction, mitochondrial membrane potential was evaluated by flow cytometry (FACScalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) at two time points (48 and 72 h). PDL cells (6×10^4 cells/well) were incubated with material extraction for 24 h at 37°C (3 replicates to each material and control). Rhodamine 123 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) was incubated (3 μ L) with the treated cells for 15 minutes at room temperature. Emission wavelength was adjusted to 515-530 nm (FL1). CellQuest software v 3.0.1 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) was used for data analysis.

Statistical analysis

Values obtained in individual experimental series were compared using ANOVA with three factor interactions (sealer chemical composition, setting reaction and time point) ($p < 0.05$).

Results

At fourteen days post extraction, cells were observed extending from the explants, and by 28 days the cells were confluent and passage at this time.

Cytotoxicity of all material was determined by MTT assay (Table 2 and Figure 1). There was interaction among three factors (moment, period, material) in the activity of dehydrogenase mitochondrial ($p < 0.0001$). At first time point (24 h), all materials were toxic independent at set condition. From 48 h, Sealer 26 and White Portland Cement showed the increase at the cell viability, which continued in the third time point (Figure 1A). There is no difference ($p > 0.05$) from the last period between White Portland Cement or Sealer 26 and control. Different behavior was induced on cells treated with Sealer α or Endofill for three time points (Figure 1A).

After set reaction, just White Portland Cement maintained cell compatibility in growing for time analyzed (Figure 1B) by MTT assay. The other materials were toxic at all experiment.

However, sealer chemical composition was the only one to change $\Delta\Psi_m$ ($p < 0.0001$) (Table 3 and Figure 2). Others factors (setting reaction and time point) do not cause membrane damage. In addition, there was no difference between Sealer α or White Portland cement ($p > 0.05$) and control. There was no difference at cell reaction caused by Sealer 26 or Endofill ($p > 0.05$). Both were different with control ($p < 0.05$) (Figure 2).

Table 2: Cell viability of human PDL cells after contact of root perforation repair material extract by MTT assay

	Fresh Material			Set Material		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Endofill	3,906±0,739	4,477±0,747	2,232±0,372	5,980±0,196	3,971±0,381	4,244±0,920
Sealer 26	4,598±0,267	23,49±4,634	62,994±9,439	5,850±0,557	3,720±0,345	4,151±0,494
Sealer α	9,861±1,211	3,910±1,497	3,308±0,315	7,941±0,259	4,747±0,495	5,102±0,106
WPc**	5,596±1,164	46,602±3,015	55,526±4,473	4,673±0,408	43,816±3,699	71,081±18,355

*control is 100%

**White Portland cement

Table 3: Mitochondrial membrane potential of human PDL cells after contact of root perforation repair material extract.

Materiais	Fresh Material		Set Material	
	48 h	72 h	48h	72 h
Controle	66,30929	66,47284	67,16539	64,92656
Endofill	32,64352	26,31561	38,74988	50,92025
Sealer 26	60,17041	28,00133	40,92478	60,51449
Sealer α	38,84725	51,82303	58,67220	61,93046
WPc*	63,53895	61,57213	63,11763	58,90177

*White Portland cement

Discussion

Most studies regarding biocompatibility frequently utilize extractions from endodontic materials and involve incubating for 72 h with culture medium (11). In this situation, culture medium stays stagnant and may come into chemical equilibrium with the material. Thus, while replacing the culture medium every 24 h does not equal the environment *in vivo*, this method allows new chemical equilibrium every 24 h and the release of toxic by-products for that period of time.

The MTT assay is widely used for analyzing cell viability (16). Metabolically active cells reduce the tetrazolium salt into dark blue formazan (16, 17). The exact mechanism of MTT reduction is not yet understood, but the mitochondrial dehydrogenase system and other subcellular fractions involving NADH and NADPH-dependent mechanisms may cause MTT reduction (16, 17).

All materials were toxic when freshly mixed according to the MTT assay (Figure 1). These results corroborate previous studies (5, 9, 18). However, 24 h post set stage, they caused a decrease in cell viability as fresh material ($p < 0.0001$). The results suggest that endodontic materials are toxic regardless of the set stage.

Endofill is a zinc oxide-eugenol based sealer and proved to be the most toxic material when compared to other compounds. Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) may be released during the set reaction or from the hydrolysis of zinc eugenolate (19). The free eugenol is incorporated into the lipid bilayer of biomembranes and enhances their fluidity (20, 21). The glutathione depletion may be other mechanism of eugenol-induced cytotoxicity (21, 22). The hydrolysis of zinc eugenolate can release zinc, which, in small concentrations, may inhibit respiration in mammalian cells and thus change $\Delta\Psi_m$ (23).

Several studies have indicated that the cytotoxicity of eugenol is dose-dependent (18-20, 22). The Endofill does not have a powder/liquid ratio determined by the manufacturer. Thus, different proportions of the powder and liquid may be used according clinical conditions, with more or less eugenol.

Sealer 26 is epoxy resin-based and contains calcium hydroxide. Like AH 26, it also releases formaldehyde during set stages (24). Not only the powder, but the liquid is described as toxic and main causative factor for high cytotoxicity (25). The glutathione depletion might be one of the mechanisms underlying epoxy resin-based induced cytotoxicity (10, 21). The toxicity is dose-dependent and remnant liquid sealer post-mixing may be more toxic than cured sealer (25). However, resin epoxy has increased solubility at pH 7.0 after 24 h (26). This behavior may have induced a strong cytotoxic effect at set conditions tested.

Bioactive oxide-based endodontic material showed the same cytotoxicity as others materials, but it was not possible to define which component is the toxic, because as it was the only one that interacted with culture medium after 48 h post set state. There was a decolorization of phenol red at the post 48 h after set state. This decolorization occurs when ultra reactive oxidative agents interact with ultraviolet irradiation (27). However, we did not use photocatalytic degradation during this study, thus more specific studies are needed to verify this chemical reaction

White Portland cement releases arsenic in accordance to ISO 9917-1 (28). It was as cytotoxic as other endodontic materials tested and caused decreasing enzyme activity ($p < 0.0001$). However, this toxic effect encompassed a shorter period compared to others materials.

Different types of cell population, different metabolism rates, extracts that contain free thiols or other antioxidants substances, plasma membrane dysfunction and cell cycle arrest can change MTT reduction (17). These factors may explain the difference between the results of the MTT assay and $\Delta\Psi_m$. Stem cells of the periodontal ligament has a cell cycle longer than fibroblast (29) and metabolism rates slower than other cells.

The results suggest that the materials caused changes in $\Delta\Psi_m$ based on their compositions (Figure 2). More specific studies are needed to demonstrate the real toxic component of Sealer 26, as Sealer α has the same resin and the same catalysis system but yielded difference results. Sealer 26 led to decrease the mitochondrial membrane polarization. However, the set reaction of Sealer α totally inhibited at fresh condition and after 24 h the setting reaction the surface layer reaction with culture medium and changed the surface hardness.

Although Sealer α exhibit greater oxidative potential than the other materials, this did not change the $\Delta\Psi_m$. Our results were in agreement with previous studies which showed that the attack oxidative factors could not be the mechanism for cytotoxicity (10, 25).

Despite the low reduction of MTT, the flow cytometry shows that the energy production by mitochondria is relatively preserved after exposure to endodontic material extracts.

Conclusion

We conclude that the white Portland cement caused minor changes in cell viability and both, it and the new bioactive oxide-based cement do not cause changes in mitochondrial membrane potential. Therefore, these materials may cause pathological changes that delay the start of the repair process.

References

1. Alhadainy HA. Root perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78(3):368-74.

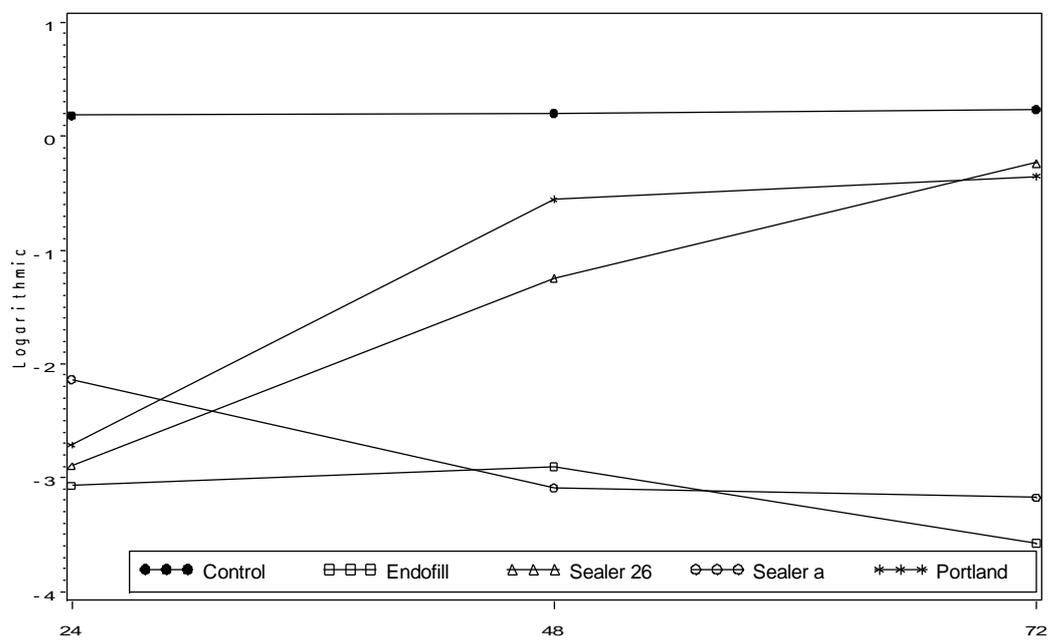
2. Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and HTERT gene transfer. *Cell Tissue Res.* 2006;324:117-25.
3. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006;41(303-310):303.
4. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide and two Portland Cement. *Int Endod J.* 2006;39:213-9.
5. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho E, Plotkowski M, T C-F. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005;38:604-9.
6. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, K M, T I. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone related protein mRNAs. *Int Endod J.* 2005;38:203-10.
7. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel-Filho E, Coutinho-Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J.* 2006;39:293-8.
8. Lee Y-L, Lee B-S, Lin F-H, Lin AY, Lan W-H, Lin C-P. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials.* 2004;25:787-93.
9. Bouillaguet S, Wataha J, Lockwood P, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci.* 2004;112:182-7.
10. Huang F-M, Chang Y-C. Prevention of epoxy resin-based root canal sealers-induced cyclooxygenase-2 expression and cytotoxicity of human osteoblastic cells by various antioxidants. *Biomaterials.* 2005;26:1849-55.
11. Souza N, Justo G, Oliveira C, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J.* 2006;39:40-7.
12. Jiang J, Huo K, Chen S, Xin Y, Xu Y, Wu Z, et al. Intracellular chromosome breaks on silicon surface. *Biomaterials.* 2009;30:2661-5.
13. Hing KA. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. *Int J Appl Ceram Technol.* 2005;2(3):184-99.
14. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res.* 1999;44(4):389-96.
15. Lee K-W, Williams M, Camps J, Pashley D. Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. *J Endod.* 2002;28:684-8.

16. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
17. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69:581-93.
18. Keiser K, Johnson C, Tipton D. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2000;26(5):288-91.
19. Hume W. The pharmacological and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *JADA*. 1984;113:789-91.
20. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res*. 1988;67(11):1438-41.
21. Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials*. 2001;22:1459-66.
22. Ho Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*. 2006;39:389-93.
23. Dineley KE, Richards LL, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*. 2005;5:55-65.
24. Spangberg L, Barbosa S, Lavigne G. AH26 releases formaldehyde. *J Endod*. 1993;19(12):596-8.
25. Huang T-H, Yang J-J, Li H, Kao C-T. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*. 2002;23:77-83.
26. Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J*. 2003;36:660-9.
27. Hachem C, Bocquillon F, Zahraa O, Bouchy M. Decolourization of textile industry wastewater by photocatalytic degradation process. *Dyes and Pigments*. 2001;49:117-25.
28. Bramante C, Demarchi A, Moraes I, Bernadineli N, Garcia R, Spangberg L. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2008;106:909-13.
29. Lekic P, McCulloch C. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*. 1996;245:327-41.

Figure 1: MTT assay of human PDL cells 24 h after addition of root perforation repair material extract. Graph A represents fresh material extraction and graph B represents the set stage.

Figure 2: Mitochondrial membrane potential of human PDL cells 24 h after addition of root perforation repair material extract. Graph A represents fresh material extraction and graph B represents the set stage.

A



B

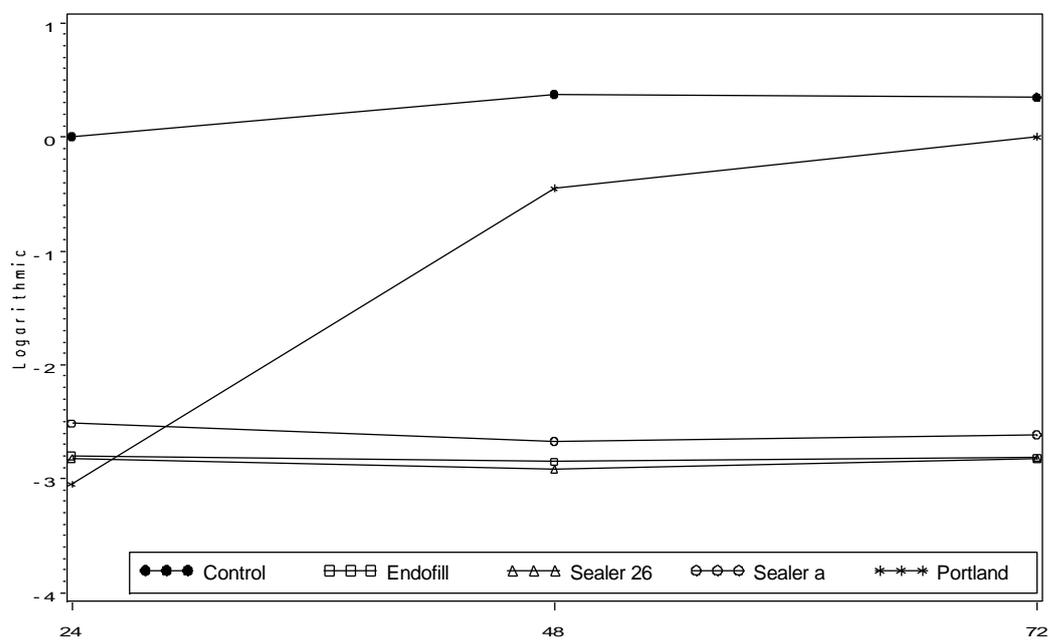
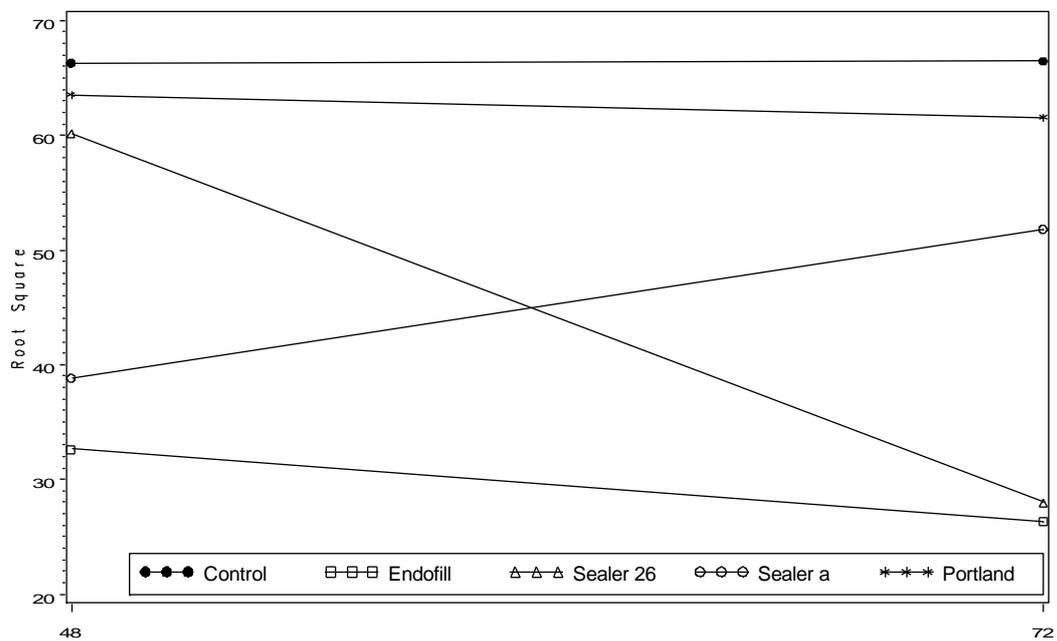


Figure 1

A



B

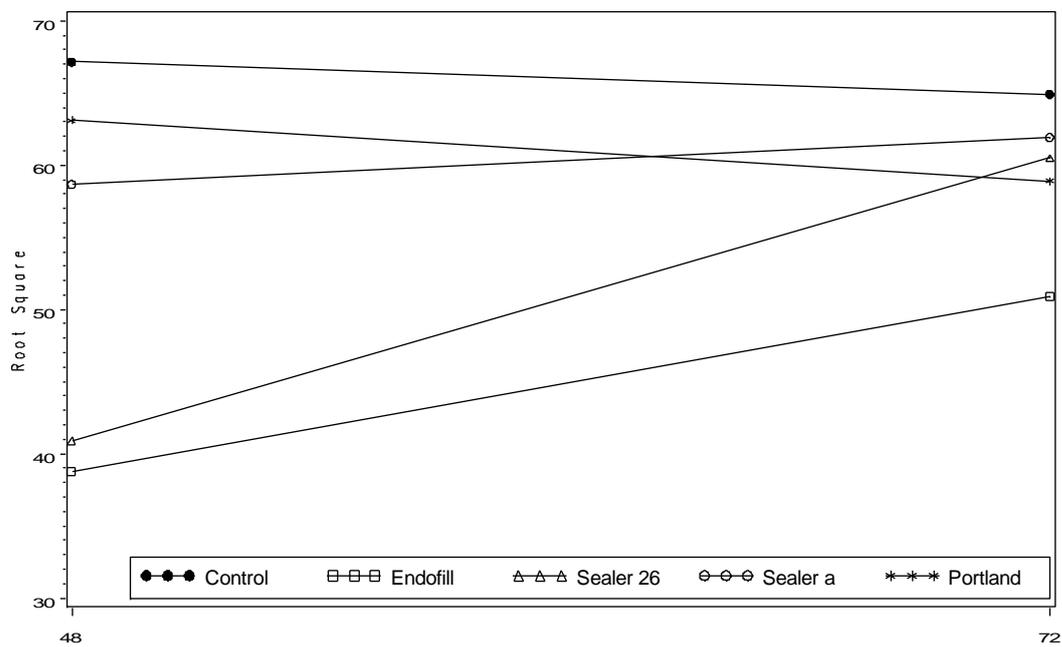


Figure 2

Anexo 2

Carta de aceite para o artigo "Cytotoxicity of endodontic material used for perforation repair on human periodontal ligament fibroblasts"

Brazilian
Oral Research



Termo de aprovação comitê de ética

São Paulo, 05 de abril de 2010

Aos autores

Debora F. Carneiro

Ana Cristina B. Bezerra

A avaliação da Comissão Editorial frente às observações realizadas pelos revisores considerou o artigo "CITOTOXICITY OF AN ENDODONTIC MATERIAL USED FOR PERFORATION ON HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS" **aprovado** para publicação na Revista Brazilian Oral Research.

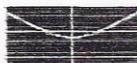
Agradecemos o envio e esperamos continuar a contar com sua colaboração.

Atenciosamente,

Sigmar de Mello Rode
Editor Científico da BOR.
Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: 55 11 3091-7810

Anexo 3

Termo de aprovação comitê de ética



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

Anexo 4

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

1- Teste MTT

Registro do Projeto no CEP: **30/09**

Título do Projeto: Avaliação da citotoxicidade de materiais endodônticos no tratamento de perfurações radiculares

Pesquisadora Responsável: Débora Ferreira Carneiro

Data de Entrada: 05/05/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **30/09** com o título: “Avaliação da citotoxicidade de materiais endodônticos no tratamento de perfurações radiculares”, analisado na 4ª Reunião Ordinária, realizada no dia 12 de Maio de 2009.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 21 de Maio de 2009.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

Anexo 4

Descrição detalhada dos testes de citotoxicidade e de genotoxicidade

- 1- Teste MTT
- 2- Determinação do potencial de membrana mitocondrial e morfologia por citometria de fluxo
- 3- Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo

1- Teste MTT

Foram plaqueadas 1×10^4 célula/poço com 200 μL de meio de cultura em placa de 96-poços. A placa foi mantida em estufa 37°C com 5% CO_2 por 48 h.

Decorrido esse período, foi recolhido o meio de cultura de cada poço e substituído por 150 μL do meio de cultura que contém o extrato do material avaliado, de acordo com o período de avaliação. Cada material foi avaliado em triplicata. A placa foi novamente levada à estufa e mantida nesse ambiente para incubação por 24 h.

Após o período de incubação, todo o meio de cultura foi descartado e cada poço recebeu 150 μL de uma solução de estoque de MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*] (Sigma, USA) preparada imediatamente antes do uso (15 μL de MTT [5mg/mL] e 135 μL de meio de cultura).

O preparo da solução de estoque e a transferência para os poços foram realizados em câmara de fluxo laminar com iluminação reduzida para não alterar a solução de MTT. A placa foi incubada em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO_2 por 3 h.

Após esse período, mantendo o cuidado com a luz, o meio foi removido e em cada poço foi adicionado 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) necessários para a dissolução dos cristais de formazan azuis.

A placa foi cuidadosamente agitada para uniformizar a cor e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Espectrofotômetro modelo V-530, Jasco, Japão) (densidade óptica de 595 nm) acoplado à leitora de microplaca (Modelo 3550 V-BioRad, EUA).

2- Determinação do potencial de membrana mitocondrial e morfologia por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 6×10^4 células/poço em placas de 12-poços com 1 mL de meio de cultura por um período de 48 horas, em estufa a 37°C com 5% CO_2 .

Decorrido este período, o meio de cultura de cada poço foi substituído por 1 mL do meio contendo o extrato do material relativo aos Momentos I ou II no período

de 48 e 72 horas. Cada material avaliado foi testado em triplicata. As células foram incubadas por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, o meio de cultura de cada poço foi transferido para um tubo Eppendorf, devidamente identificado, e levado à microcentrífuga (Centrífuga Mikro 22R, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Alemanha) por 5 minutos (temperatura 4°C e 1000 rpm). Em cada poço das placas foram adicionados 500 µl de tripsina (Tripsina-EDTA, 0,25 e 0,02%, Gibco, USA). As placas retornaram à estufa por um período de 5 minutos.

Do material centrifugado, foram descartados 400 µl do sobrenadante e o restante foi transferido para o seu poço de origem. Cada poço foi lavado duas vezes com o meio e todo conteúdo foi novamente transferido para o tubo Eppendorf para uma nova centrifugação (5 minutos, 4°C, 1000 rpm).

Do material centrifugado, foi descartado o líquido sobrenadante até a marca de 100 µl do tubo Eppendorf. Foram adicionados 300 µl de PBS (Laborclin, Brasil) no grupo controle e 200 µl de PBS demais grupos. Logo depois foram adicionados 3 µl (controle) e 2 µl (demais grupos) de rodamina 123 (Invitrogen, EUA). Os tubos Eppendorfs foram deixados em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente, e no escuro.

Após esse período de incubação, os tubos foram novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado até a marca de 100 µl do tubo Eppendorf. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e novamente centrifugadas.

Após essa nova centrifugação, o máximo do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µl de PBS (controle) e 200 µl de PBS (demais grupos) e mantidas, no escuro, até a leitura no citômetro de fluxo (FACSCallibur, Becton & Dickenson, EUA) (intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 515-530 nm – FL1). Os dados obtidos da leitura foram analisados pelo programa CellQuest software versão 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA).

3- Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 6×10^4 células/poço em placas de 12-poços com 1 mL de meio de cultura por um período de 48 horas, em estufa a 37°C com 5% CO₂.

Decorrido este período, o meio de cultura de cada poço foi substituído por 1 mL do meio contendo o extrato do material relativo aos momentos I ou II no período de 48 e 72 horas. Cada material avaliado foi testado em triplicata. As células foram incubadas por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, o meio de cultura de cada poço foi transferido para um tubo Eppendorf, devidamente identificado, e levado à microcentrífuga (Centrífuga Mikro 22R, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Alemanha) por 5 minutos (temperatura 4°C e 1000 rpm). Em cada poço das placas foram adicionados 500 µl de tripsina (Tripsina-EDTA, 0,25 e 0,02%, Gibco, USA). As placas retornaram à estufa por um período de 5 minutos.

Do material centrifugado, foram descartados 400 µl do sobrenadante e o restante foi transferido para o seu poço de origem. Cada poço foi lavado duas vezes com o meio e todo conteúdo foi novamente transferido para o tubo Eppendorf para uma nova centrifugação (5 minutos, 4°C, 1000 rpm).

Do material centrifugado, foi descartado o líquido sobrenadante até a marca de 100 µl do tubo Eppendorf. Em cada tubo foram adicionados 200 µl da solução tampão de lise contendo iodeto de propídeo (0,1% de citrato de sódio [Invitrogen, EUA], 0,1% Triton X-100 [Merck, Alemanha] e 20 µg/mL de iodeto de propídeo diluído em PBS, pH 7,4).

Os tubos foram incubados por 30 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente até a leitura no citômetro de fluxo (intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm – FL2). Os dados obtidos da leitura foram analisados pelo programa CellQuest software versão 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA).

Anexo 5

Morphological cell changes at human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials.

Será enviado para Journal of Periodontal Research

Morphological cell changes at human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials.

Débora F. Carneiro, MD 1 and Ana Cristina Barreto Bezerra, DDS, PhD 2

1 Postgraduate researcher, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

2 Associate Professor, School of Dentistry, Post-Graduate Program of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Keywords: cell shrinkage, dental materials, pH, cell morphology

Abstract

Background and Objective: Root perforation repair with endodontic materials can be change periodontal tissue. The aim of this study were evaluated the cell shrinkage at human periodontal ligament cells following contact with a new bioactive oxide-based endodontic material as compared to commonly used endodontic materials, and compare pH changes at the material extract.

Material and Methods: Cell skrinkage was evaluated by observing a loss of cellular volume by flow cytometry. The cells (6×10^4 cells/well) were incubated for 24 hours at 37°C, with material extracts in two conditions (fresh or set stage). The extraction was executed in two distinct time point after mixed (48 e 72 h for fresh material; 72 e 96 h for set stage). After contact, the cells were harvested and incubated with 3 μ L rodhamine 123 solution and the emission wavelength was adjusted to 515-530 nm (FL1). The CellQuest software v 3.0.1 was used for data analysis. The values obtained were compared using ANOVA with three factor interactions. The loss of cellular volume associated with cytoskeletal breakdown and blebbing of the plasma membrane was viewed by microscopy. pH was measured at the material extract at varying time intervals with calibrated pHmeter.

Results: Sealer 26, Endofill and a new bioactive oxide-based endodontic material caused significant cell skrinkage ($p < 0.0001$) and morphological changes that suggest apoptosis. Moreover Sealer 26, white Portland cement and a new endodontic material caused pH increase at culture media.

Conclusion: Endodontic materials can cause cell volume changes and pH disruption after contact and this can retard healing.

Introduction

The regulation of cell volume is essential for several cellular functions (1). The regulatory mechanisms including ion channels, plasma membrane transporters and cytoskeletal reorganization (2). Cells maintain cell volume by activating regulatory volume increase (RVI) and regulatory volume decrease (RVD).

The decrease in cell volume can be prevented by inhibition of some ions such as Cl⁻, however, if the reduction will reach 70% of original volume for a period exceeding 3 h may occur activation of apoptosis independent of death ligand (3).

The apoptotic process is characterized by unique events morphological and biochemical changes such as nuclear condensation, DNA fragmentation, a loss of cellular volume associated with cytoskeletal breakdown and blebbing of the plasma membrane (4, 5). Of all these characteristics only the loss of cellular volume is common to all cell (6) and is the one that occurs in isotonic medium, independent of the activation of caspases and other organelles (5).

The periodontal tissue may suffer a traumatic lesion, such as root perforation. After this lesion occurs, chronic inflammation has been suggested to cause the resorptive process and destruction of the functional periodontal attachment apparatus (7). Endodontic materials used in the repair of root perforations may change the environment from the release of ions and other chemical compounds (8, 9). Such sub-products may generate signals that lead to activation of caspases, and consequently cell apoptosis (10). However, these materials have not been shown to retard, prevent, or modify the healing process (11).

In an *in vivo* system, the apoptotic process does not activate the inflammatory response (6). In an *in vitro* system, the changes of the medium can be overestimated by any concentration of factors.

The aim of this study is to analyze volumetric changes that occur in human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials extract and evaluate the changes that cause these extracts in the pH of the culture medium.

Materials and Methods

Cell culture of human periodontal cells

The cells for this study were obtained from the periodontal ligaments (PDL) of 2 third molars from one individual (34 years old) undergoing complete bony impaction. This study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Health Science at the University of Brasilia. Immediately before the procedure, the patient was instructed to gargle for 2 minutes with a 0.12% chlorhexidine solution.

The teeth were extracted and rinsed with a saline solution and were placed in a falcon tube with culture media (*i.e.*, DMEM, with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 μ L streptomycin [Gibco – Invitrogen, EUA]). The tubes with the teeth were taken to the morphological laboratory, and in a laminar flow chamber (Veco, Brazil), the teeth were then transferred to 25-cm² tissue culture flasks containing 5 mL of culture media, and were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (Tecnal, Brazil). When the cells surrounding the teeth were confluent, they were transferred to a 75-cm² tissue culture flask and were designated as the first transfer cells. These cells were used in this study.

Treatment of cells

The materials that were tested are listed in Table 1. All of the sealers were commercially available, except for Sealer α . The materials were mixed according to the manufacturer's instructions. Sealer α has the same epoxy resin as Sealer 26 and was therefore mixed according to the manufacturer's instructions for Sealer 26. All of the sealers were mixed at one time in a laminar flow chamber and placed into the bottom of a 12-well plate in order to achieve a thickness of approximately 1 mm (three well to each material and control). For the extraction media, 3.4 mL DMEM was added on each sample. The extraction was executed in two conditions (fresh or set material, *i.e.*, after 24 h at 37°C in a humidified chamber), and performed at two distinct time points: 48 or 72 h in 5% CO₂ at 37°C after mixed to fresh material; 48 or 72 h after media addition to set material in 5% CO₂ at 37°C. For each 24 h period, the culture media from the extraction was transferred to a Falcon tube and new media was placed on the material. A control extraction was prepared in an identical manner, but there was not material added to the well.

Cellular volume analyse by flow cytometry

PDL cells (6×10^4 cells/well) were seeded in 12-well plate in 1 mL culture medium. After incubation for 24 h, the culture medium was removed and replaced by extracted material (1 mL) and control extract and they were incubated for 24 h at 37°C. Then the cells were harvested, collected by centrifugation, and incubated with 3 μ L rodhamine 123 (Invitrogen, EUA) for 15 min at room temperature. The emission wavelength was adjusted to 515-530 nm (FL1). The CellQuest software v 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA) was used for data analysis. The values obtained in the individual experimental series (3 replicates to each material and control) were compared using ANOVA with three factor interactions (sealer chemical composition, setting reaction and time point) with post hoc Tukey test. Significance levels were set at $p < 0.05$.

Morphological Analysis

The cells incubated with fresh culture media were analyzed in terms of subconfluence, and confluence in the phase inverted microscope (Unico, USA). The cells incubated with extracts of materials were compared with those on the way to the extensions, the core position and other aspects visible on microscopic examination. Image acquisition was performed using a digital camera (Zeiss, Germany) attached to the eyepiece of an inverted light microscope and acquisition software Scope (version 1.0.0.0, 2003).

Analysis of the pH of the extract

Immediately after the transfer of the extract material for a Falcon tube, it was performed to measure the pH of the extract with calibrated pHmeter (Tecnocon, Brazil). Three measurements were made from each Falcon tube, at room temperature (23°C), until equilibrium. The pH was determined by the arithmetic mean of three measurements. The analysis was performed by ANOVA (two-way) with significance level $p < 0.05$.

Results

At fourteen day post-extraction, we observed cells extending from the teeth, and by 28 days the cells were confluent and were passaged at this time.

Volumetric Analysis

The volume changes were analyzed from the changes of the parameter forward-angle light scatter (FSC), which represents the cell volume, versus the parameter side-angle light scatter (SSC), which represents the granularity of cells (Figure 1).

In the analysis of these parameters Sealer 26, Sealer α and Endofill caused major changes in the cells, since there was a marked reduction in the volume and granularity, suggest that there has been a process of apoptosis. Nevertheless, the loss of cellular volume after contact with Sealer 26 is a little slower, because with the analysis after 48 hours, there is an increase in the SSC parameter characteristic of the early changes of apoptosis.

Already the white Portland cement remained close to control in both conditions analysis (fresh or set material). Statistical analysis showed no difference between control group and the white Portland cement ($p > 0.05$).

The differences between the materials and the control were significant ($p < 0.0001$) only in the individual factor (Table 2). This result demonstrates that

independent of observation time (48 or 72 h) or setting reaction (fresh or set material), volumetric changes are derived from the material composition and what they release into the medium (Figure 2). Endofill, Sealer α and Sealer 26 did not differ statistically from one another, but differ significantly from control groups and white Portland cement.

Morphological Analysis

The evaluation of cell morphology for the different materials varying time intervals. There were marked differences in cell morphology between cells cultured in contact with extract of Endofill and Sealer 26, and those control culture. The cells in contact of Endofill or Sealer 26 were rounded and with blebbing of their plasma membrane. Due to the large amount of sediment removed by Sealer α , even after filtration of the extract with 0.22 μm filter, it was not possible to showed the cells. In contact with the extracts of white Portland cement, periodontal ligament cells exhibited a volume decrease, but the shape was preserved.

Analysis of pH

The average pH of the culture media after contact with the material endodontic is displayed in Figure 3. The change in culture media pH caused by fresh materials was significant between groups ($p = 0.0427$). However there was no difference between times (24, 48 or 72 h). When evaluating the pH of the culture media after a period of 24 hours (set material), it is observed that there was statistical difference between both groups ($p = 0.0139$) and between periods ($p = 0.0245$).

Discussion

The loss of cell volume activates many internal changes such as changes in the cytoskeleton and subsequent loss of mitochondrial membrane potential (12). The release of toxic substances from the materials affects not only cell morphology, but the adherence behavior of cells (13). The proliferation and migration of periodontal ligament fibroblasts are prerequisites for the synthesis of protein structure and remodeling of the periodontal ligament (14).

Among the causes for volumetric change of the cells there are the changes of the ionic medium, the apoptotic process and pH. Changes in pH can disturb several cellular functions including cell proliferation and differentiation (15).

The periodontal ligament cells growth at pH 7.4 (16). Above pH 7.8, cells showing morphological and physiological changes suggestive of apoptotic processes

(14), probably independent of activation of caspase-3 because this has inhibited by high pH (17).

All materials change the pH of the environment; however the buffer system minimizes the effect. The most used is the bicarbonate buffer that converts CO₂ from the atmosphere and maintains the optimum pH (18).

The Sealer 26, Sealer α and white Portland cement caused the greatest changes in pH. All three have calcium in the composition in the form of oxide or hydroxide, which is the agent of change. The differences between them are related to other material characteristics that can keep the [OH⁻] on the surface for variable periods (19, 20).

The analysis of these ions released is important not only for changing the pH of the culture media, but because the ionic movement across plasma membrane can disturb your metabolism and promote cell shrinkage (6). In the present investigation, the chemical composition of the materials was responsible for volumetric changes, but it is uncertain the real cause this change: chemical composition, like Endofill, only pH or both factors.

The volumetric change observed in this study was the cell shrinkage. In flow cytometry, analysis of parameters FSC and SSC is able to identify both necrotic processes as the apoptotic processes (21, 22). Necrosis occurs in the rapid increase in FSC, because of edema, and reduction of the SSC by the fragmentation of organelles. While in the apoptotic process occurs, initially, a decrease of FSC, due to loss cell volume and an increase of SSC by chromatin condensation and nuclear fragmentation. In late process it occurs the decrease of both parameters.

However, there is a change in osmolarity of the culture media may occur a decrease in cell volume followed by a regulatory volume increase (RVI), without triggering the cell death process (6). The decrease in cell volume observed in this work, after contact with extracts of materials, can activate apoptosis or not depending on the regulatory capacity of the cell.

The morphological changes displayed by cells in contact with extract zinc oxide eugenol-based sealers are corroborated by previous studies (23, 24) as well as the behavior of cells in the presence of extracts of white Portland cement (13, 23). The changes observed in cells that were in contact with the Endofill are suggestive of apoptosis are presenting granules on the surface, like apoptotic bodies. Sealer 26 was marked cell death by disruption of the cytoskeleton. Presence of vacuoles in the surface and the change in cell shape suggest the toxicity of the material (13).

Conclusion

We conclude that the periodontal ligament cells undergo changes in volume and shape after contact with endodontic materials. These materials are able to change the pH of the culture media.

References

1. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;532.1:3-16.
2. Gómez-Angelats M, Bortner C, Cidlowski J. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(33-42):33.
3. Ernest N, Habela C, Sontheimer H. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. *J Cell Sci*. 2008;121(3):290-7.
4. Henery S, George T, Hall B, Baiji D, Ortyn W, Morissey P. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*. 2008;13:1054-63.
5. Bortner C, Cidlowski J. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462:176-88.
6. Bortner C, Cidlowski J. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:1549-59.
7. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. *Journal Dental Research*. 1970;49(2):332-9.
8. Fridland M, Rosado R. Mta solubility: a long term study. *J Endod*. 2005;31(5):376-9.
9. Carneiro D, Barbosa S. Avaliação do pH dos cimentos endodônticos e considerações clínicas. *Robrac*. 1998;7(24):6-10.
10. Vaux D. Apoptosis and toxicology - what relevance? *Toxicology*. 2002;181-182:3-7.
11. Macneil R, Somerman M. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000*. 1999;19:8-20.
12. Bortner C, Cidlowski J. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21953-62.
13. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscopy study. *J Endod*. 2004;30(1):25-9.
14. Lengheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts in vitro. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:148-55.
15. Cutaia M, Black A, Cohen I, Cassai N, Shidu G. Alkaline stress-induced apoptosis in human pulmonary artery endothelial cells. *Apoptosis*. 2005;10:1457-67.
16. Lengheden A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts in vitro. *Scand J Dent Res*. 1994;102:130-6.
17. Segal M, Beem E. Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:1196-204.
18. Cartwright T, Shah G. Culture media. In: Davis J, editor. *Basic cell culture - a practical approach*. New York: Oxford University Press; 1994. p. 57-91.

19. Tay F, Pashley D, Rueggeberg F, Loushine R, Weller R. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod.* 2007;33:1347-51.
20. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999;44(4):389-96.
21. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997;27:1-20.
22. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death. *Journal of Immunological Methods.* 2000;243:167-90.
23. Koh E, Torabinejad M, Pitt Ford T, Brady K, McDonald F. Mineral Trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:432-9.
24. Koulaouzidou E, Papazisis K, Economides N, Beltes P, Kortsaris A. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod.* 2005;31(1):44-6.

Table 1: Sealers that were tested

Type	Product	Manufacturer	Composition
Bioactive oxide	Sealer α	University of Brasilia, Brazil	<p>Powder: oxide (CaO, SiO₂, P₂O₅) 36%, Hexamethylenetetramine 4%, BaSO₄ 60%.</p> <p>Liquid: bisphenol-A-diglycidylether 100%</p>
Epoxy resin	Sealer 26	Dentsply, Rio de Janeiro, Brazil	<p>Powder: Bismuth(III)oxide, calcium hydroxide, hexamethylenetetramine, titanium dioxide.</p> <p>Liquid: bisphenol-A-diglycidylether (Batch # 791827)</p>
Zinc oxide-eugenol	Endofill	Dentsply, Rio de Janeiro, Brazil	<p>Powder: zinc oxide, hydrogenated resin, (BiO₂)₂CO₃, BaSO₄, Na₂B₄O₇.</p> <p>Liquid: eugenol and oil of sweet almonds (Batch # 792680)</p>
White Portland Cement	Rejuntamento Flexível Quartzolit	Saint-Gobain Quartzolit, Brazil	<p>Powder: white Portland cement, inorganic pigments, nontoxic chemical additives. (Batch: not identified)</p>

Table 2: Volume cell changes of human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials.

Materials	Fresh material		Set material	
	48 h	72 h	48 h	72 h
Control	25,403972	25,198134	25,297732	28,782450
Endofill	44,876393	67,056815	67,309002	66,132093
Sealer 26	53,467319	42,308872	60,686816	60,246130
Sealer α	65,658045	47,068704	60,647104	52,001454
WPC*	35,693931	21,614481	30,314993	31,897214

* White Portland cement

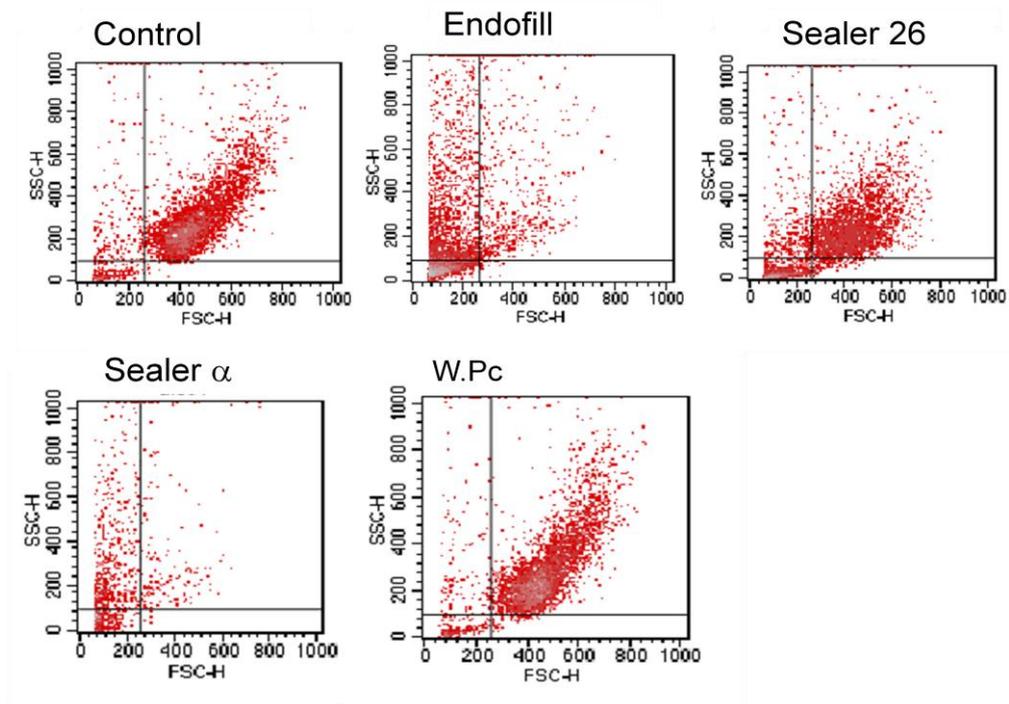
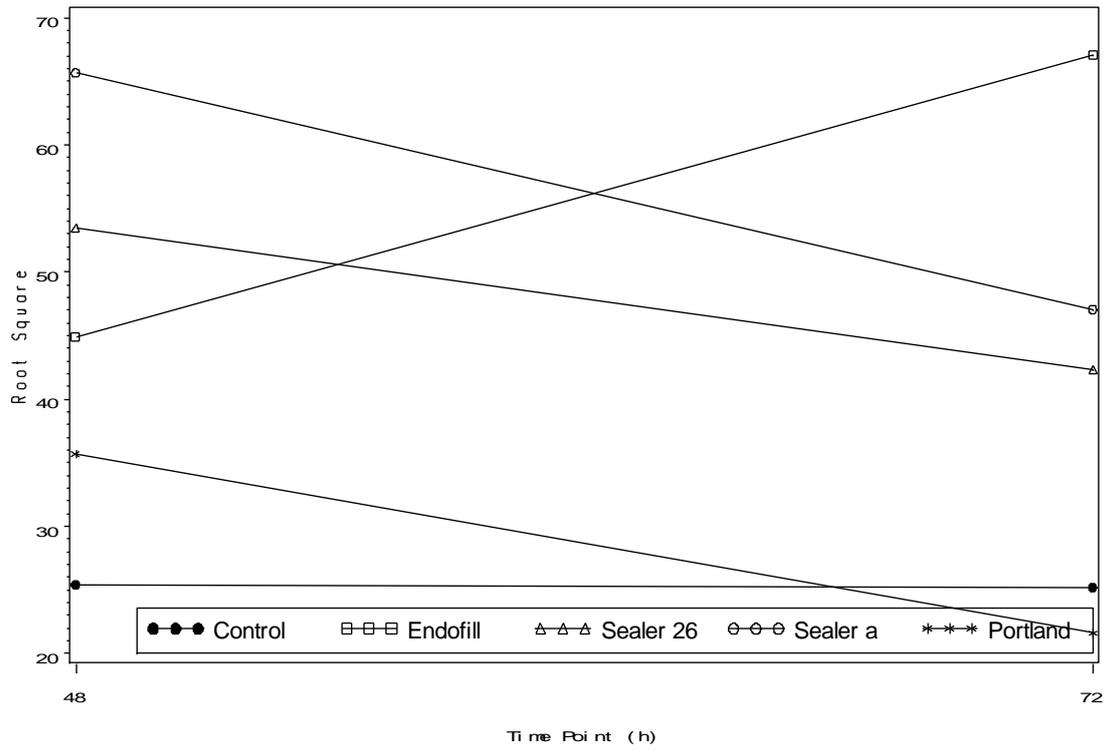


Figure 1: Example of FSC and SSC changes at human periodontal ligament cells after contact with endodontic materials. Endofill and Sealer α cause marked decreased FSC and increased SSC signals. (WPc is white Portland cement)

A



B

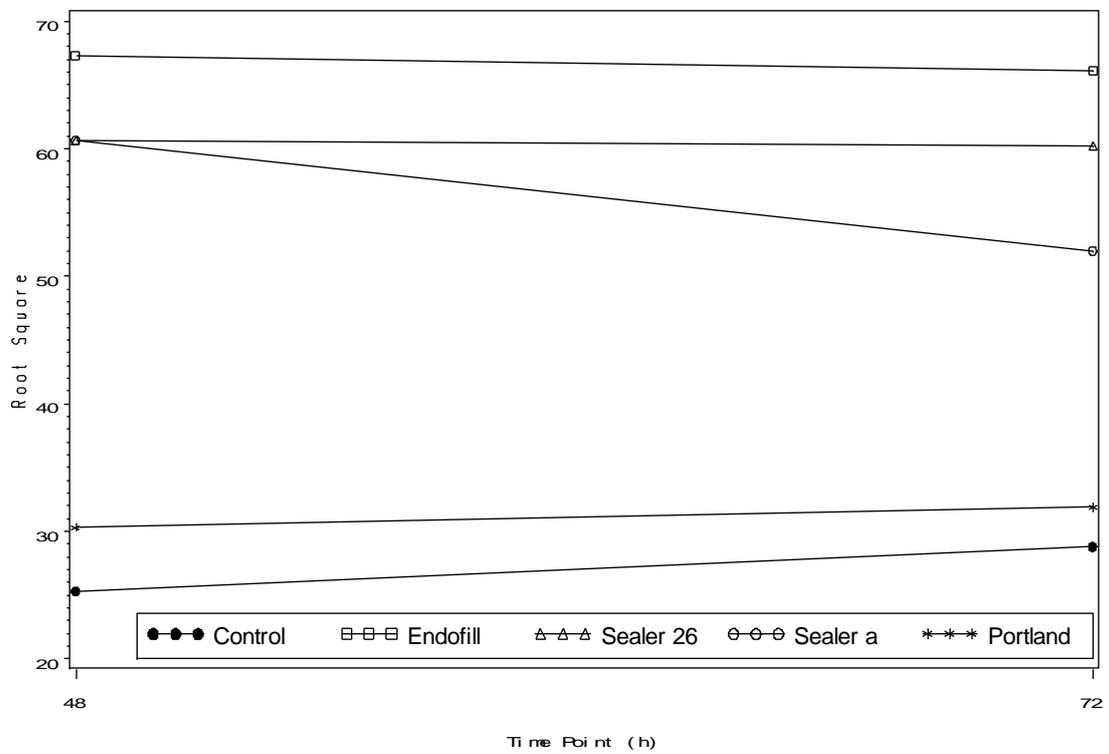


Figure 2: Loss volume cell of the human PDL cells 24 h after the addition of root perforation repair material extract. Graph A represents fresh material, and Graph B represents set materials

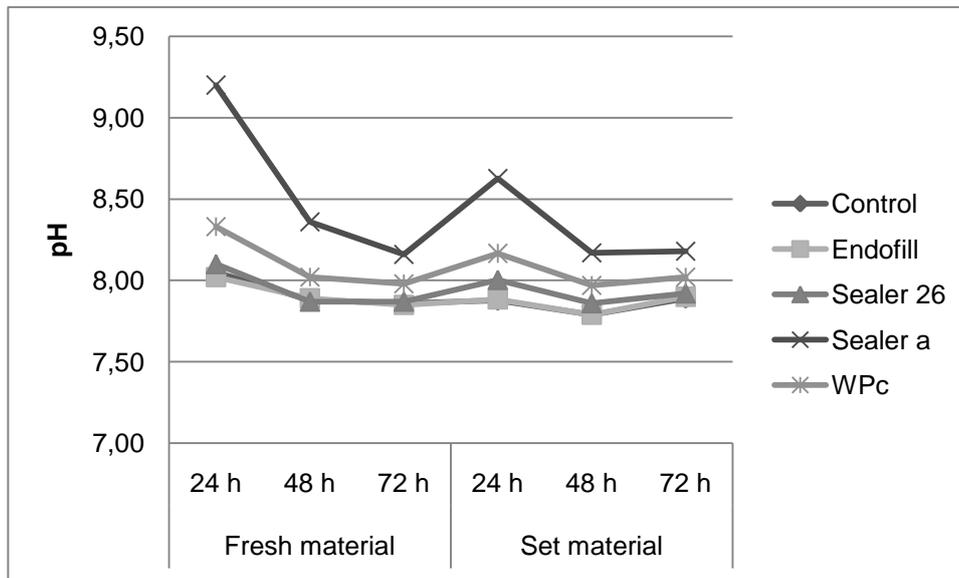


Figure 3: pH at the culture media after contact with endodontic materials. Control and Endofill have de same pH at each timepoint.

Anexo 6

Genotoxicity of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in
vitro.

Enviado para International Endodontic Journal

Genotoxicity of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro.

Débora F. Carneiro, MD 1 and Ana Cristina Barreto Bezerra, DDS, PhD 2

1 Postgraduate researcher, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

2 Associate Professor, School of Dentistry, Post-Graduate Program of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Keywords: Cell culture; Dental materials; Flow cytometry; Genotoxicity.

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the genotoxicity of a new bioactive oxide-based endodontic material as compared to commonly used endodontic materials in human periodontal ligament cells.

Methodology: Genotoxicity was evaluated by observing cellular DNA content and the cell cycle changes by flow cytometry. The cells (6×10^4 cells/well) were incubated for 24 hours at 37°C, with material extracts in two conditions (fresh or set stage). The extraction was executed in two distinct time point after mixed (48 e 72 h for fresh material; 72 e 96 h for set stage). After contact, the cells were harvested and incubated with 200 µL propidium iodide solution and the emission wavelength was adjusted to 560-580 nm (FL2). The CellQuest software v 3.0.1 was used for data analysis. The values obtained in the individual experimental series were compared using ANOVA with three factor interactions.

Results: The results demonstrated that all of the materials caused changes to the DNA from an interaction among three different factors (chemical composition, setting reaction, and time point) ($p < 0.0001$). The cell cycle changes occurred primarily when the materials were freshly mixed. A new bioactive sealer did not differ from the control after the set material on all cycle phases ($p > 0.05$). Zinc oxide eugenol-based sealer is the most genotoxic material.

Conclusion: The new bioactive oxide-based endodontic material did not induce a significant DNA damage or changes on cell-cycle. This is confirming its adequacy as a perforation root repair material.

Introduction

Root perforation is a pathological disease where space opens between periodontal tissue and pulp space. After this lesion occurs, chronic inflammation has been suggested to cause the resorptive processes and destruction of the functional periodontal attachment apparatus (Seltzer Sinai et al. 1970). Repair in the periodontal tissues involves a migration, adhesion, proliferation, and differentiation at diverse cells (Pitaru McCulloch et al. 1994). Furthermore, there are different structures with closer interactions, such as dentin, cementum, periodontal ligament and alveolar bone (Bartold Xiao et al. 2006). The cementum matrix may promote differentiation of mesenchymal cells and could also have inductive properties important for regeneration and for providing signals essential for tissue attachment (Macneil & Somerman 1993; Pitaru McCulloch et al. 1994; Zeichner-David 2006).

Cytotoxic materials can produced an extensive DNA cleavage and thus generates a large number of DNA strand breaks (Vermees Haanen et al. 2000). Therefore, the DNA damage might initiate an apoptotic cell death that is independent of or mediated by transcription factors (Kao Lemoine et al. 2001; Clarke & Allan 2009).

DNA damage signalling can also induce apoptosis and prevent the dangerous of damage cells, thus DNA damage may interrupt the cell cycle (Pardo Gómez-González et al. 2009). The cell cycle analysis is used for determination of proliferative activity. The cell cycle can be divided into four stages: G1 (pre-DNA synthesis or resting), S (DNA synthesis), G2 (post-DNA synthesis), and M (mitosis). DNA-damage-induced cell-cycle checkpoints inhibit entry into S phase, to prevent further DNA replication, progression through S phase and entry into M phase (Clarke & Allan 2009).

Root perforation may be repaired by endodontic materials, so these materials have not been shown to retard, prevent, or modify the healing process (Macneil & Somerman 1999). There is not specific material available for sealing a root perforation. Materials for perforation repair should adhere and seal the root canal system, and should also be nontoxic (Tai & Chang 2000). However, a slow release of detrimental components may also occur over long periods, depending on the material's solubility and degree of exposure to the organism (Bratel Jontell et al. 1998).

Root canal sealers and the mineral trioxide aggregate (MTA) are generally used at the apical and cervical third positions, respectively. Portland cement is similar to MTA, but it includes a higher amount of heavy metals (Danesh Dammaschke et al. 2006). Many authors have previously reported that MTA does not cause damage to DNA (Ribeiro Duarte et al. 2005; Braz Camargo et al. 2006). Zinc oxide-eugenol and epoxy resin-based sealers are described in many studies to act like genotoxic materials (Hume 1984; Kostoryz Tong et al. 1999).

Bioactive materials have the ability to perform in partnership with the host response in a specific application, such as to induce nascent hard tissue (Huang Ding et al. 2003). Most of these materials are comprised of calcium and phosphorus, but some may contain silica or magnesium (Hing 2005). These chemical modifications may influence cellular behavior or the calcification process (Zreiqat Evans et al. 1999). At the University of Brasilia, a new bioactive oxide-based endodontic material was developed for use in root perforation or as a root-end material. Epoxy resin was used as a vehicle for application and provided adhesion to the dentin (Lee Williams et al. 2002).

The aim of this study was to evaluate the cell cycle changes and cellular DNA content in the human periodontal ligament cell caused by two root canals sealers (Endofill© and Sealer

26®) and two perforation repair materials (white Portland cement and bioactive oxide-based material).

Materials and Methods

Cell culture of human periodontal cells

The cells for this study were obtained from the periodontal ligaments (PDL) of 2 third molars from one individual (34 years old) undergoing complete bony impaction. This study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Health Science at the University of Brasilia. Immediately before the procedure, the patient was instructed to gargle for 2 minutes with a 0.12% chlorhexidine solution. The teeth were extracted and rinsed with a saline solution and were placed in a falcon tube with culture media (*i.e.*, DMEM, with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µL streptomycin [Gibco – Invitrogen, EUA]). The tubes with the teeth were taken to the morphological laboratory, and in a laminar flow chamber (Veco, Brazil), the teeth were then transferred to 25-cm² tissue culture flasks containing 5 mL of culture media, and were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (Tecnal, Brazil). When the cells surrounding the teeth were confluent, they were transferred to a 75-cm² tissue culture flask and were designated as the first transfer cells. These cells were used in this study.

Treatment of cells

The materials that were tested are listed in Table 1. All of the sealers were commercially available, except for Sealer α . The materials were mixed according to the manufacturer's instructions. Sealer α has the same epoxy resin as Sealer 26 and was therefore mixed

according to the manufacturer's instructions for Sealer 26. All of the sealers were mixed at one time in a laminar flow chamber and placed into the bottom of a 12-well plate in order to achieve a thickness of approximately 1 mm (three well to each material and control). For the extraction media, 3.4 mL DMEM was added on each sample. The extraction was executed in two conditions (fresh or set material, *i.e.*, after 24 h at 37°C in a humidified chamber), and performed at two distinct time points: 48 or 72 h in 5% CO₂ at 37°C after mixed to fresh material; 48 or 72 h after media addition to set material in 5% CO₂ at 37°C. For each 24 h period, the culture media from the extraction was transferred to a Falcon tube and new media was placed on the material. A control extraction was prepared in an identical manner, but there was not material added to the well.

Flow cytometry

DNA damage and cell-cycle were evaluated by flow cytometry. PDL cells (6×10^4 cells/well) were seeded in 12-well plate in 1 mL culture medium. After incubation for 24 h, the culture medium was removed and replaced by extracted material (1 mL) and control extract and they were incubated for 24 h at 37°C. Then the cells were harvested, collected by centrifugation, and incubated with 200µL propidium iodide (PI) solution (20 µg/mL PI and 0.1% Triton-X in phosphate-buffered saline) for 30 min at room temperature. The emission wavelength was adjusted to 560-580 nm (FL2). The CellQuest software v 3.0.1 (Becton-Dickinson, EUA) was used for data analysis. The values obtained in the individual experimental series (3 replicates to each material and control) were compared using ANOVA with three factor interactions (sealer chemical composition, setting reaction and time point) with post hoc Tukey test. Significance levels were set at $p < 0.05$.

Results

At fourteen day post-extraction, we observed cells extending from the teeth, and by 28 days the cells were confluent and were passaged at this time.

The mean of cell DNA content was listed in Table 2. DNA damage resulted from an interaction among three different factors ($p < 0.0001$) (Figure 1). All of the analyses differed significantly with the control, except for the Sealer α fresh material (at 48 h). Sealer α caused less DNA damage when it was in the set stage, at 48 h the difference between Sealer α and the control was 64.2%. This difference was reduced at the next time point (72 h) to 15.9% (Figure 2)

The cell cycle also experienced changes (Table 3 and Figures 3 and 4) after the cells were treated. There was not significant difference when the cells were treated with fresh material preparations of Sealer 26, Sealer α or white Portland cement when compared to the control at 48 h at G1 phase ($p > 0.05$). However, when the material was set, Sealer α was the only material that did not differ from the control at both time points of 48 h and 72 h ($p > 0.05$)

There was not significant difference when cells treated and the control in S phase when we analyze an interaction among the three factors described above. All of the materials, when tested as fresh preparations differed from the control at 48 h ($p < 0.0001$). At next time point (72 h), there was not difference between Sealer 26 and white Portland cement with the control ($p > 0.05$). Sealer α and Portland cement did not differ from the control after the set material was tested.

Finally, all of the materials, when tested as fresh preparations, differed from the control as fresh at G2/M phase ($p < 0.0001$). When the materials were set, only Sealer α was similar to the control ($p > 0.05$).

Discussion

Periodontal ligament contains a variety of cells at different steps in differentiation such that an individual cell may proliferate in favourable conditions (*i.e.*, in culture) (Nagatomo Komaki et al. 2006). We prefer to study human periodontal cells, and thus bring the results to real system. However, we are aware of the limitations of an *in vitro* study and that this does not allow a direct comparison with the *in vivo* conditions.

Cells respond to DNA breaks through disruption of mitosis and start apoptotic response. The correct balance between cell cycle arrest, essentially a cell survival mechanism, and cell death through apoptosis is maintained through the proliferation of cells (Clarke & Allan 2009). This study showed that all of the endodontic materials tested are cytotoxic to the cell, since all of the materials caused DNA damage and cell cycle disruption. These changes were caused by the chemical composition of the materials, the set stage, and the time at which the cells were evaluated.

Unlike previous studies (Moghaddame-Jafari Mantellini et al. 2005; Ribeiro Matsumoto et al. 2006), Portland cement was found to be as genotoxic (Figure 1 and 2) as zinc oxide eugenol-based sealers after the set stage ($p > 0.05$). The difference between these and previous studies is the amount of time the cells had contact with the extract material, as well as the different concentrations of extract. In our study, severe DNA damage was observed after the cells were incubated with a 100% solution of extract that had direct contact with the cells. This damage likely occurs to the periodontal cells that maintain direct contact with the material during root repair or root-end filling.

Another substance responsible for the genotoxic activity is epoxy resin (Huang Tai et al. 2002). Diglycidyl ether bisphenol A may inhibit DNA or protein synthesis at doses ranging

from between 10 to 100 $\mu\text{mol/L}$ (Kostoryz Tong et al. 1999). However, this conclusion is unlikely because Sealer α has the same resin and catalyst as Sealer 26, but the results were different. When the material was fresh, its toxicity was greatly increased (Figure 1) because there was an interaction between the sealer and the culture media. The set reaction of Sealer α was completely inhibited when fresh mixed was used by extraction. However, when was used set material, the results suggests that Sealer α has a protective effect on the DNA since it caused 64.2% less DNA damage than the control (Table 2).

The analysis of cellular DNA content by flow cytometry with propidium iodide reveals a sub-population of cells, with reduced DNA stainability. This reduced is the consequence of progressive loss of DNA from the cells, due to activation of endogenous endonucleases (Vermees Haanen et al. 2000). Apoptosis should be suppressed in response to low levels of damage and during checkpoint arrest to permit repair and prevent unnecessary cell destruction (Clarke & Allan 2009).

In our experiment, the endodontic materials that caused major DNA damage also caused inhibit the cell growth. This antiproliferation activity was related to a cell number decrease in the S/G2/M phases and accumulation of cells in the G1 phase compared to control at 48 h when material was fresh (Valois & Azevedo 2008; Clarke & Allan 2009).

These materials are toxic when freshly mixed as set states. This observation may suggest that materials, after the setting phase, continue to release toxic substances. In agreement with results from other authors, the chemical composition affects the progression of the cell cycle phases in various manners (Barbosa Araki et al. 1993; Huang Tai et al. 2002), possible apoptotic mechanisms include increase in cytosolic calcium and nitric oxide synthase pathway (Gorduysus Avcu et al. 2007). The clinical implication of cell cycle disruption is a decrease in or a retardation of the healing process.

Conclusion

We conclude that all of the endodontic materials for root repair perforation cause DNA damage and cell cycle deregulation. However, Sealer α may provide the best environment for periodontal repair since it caused only minor damage.

References

- Barbosa S, Araki S and Spangberg L (1993). Cytotoxicity of some modified root canals sealers and their leachable components. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **75**, 357-361.
- Bartold P, Xiao Y, Lyngstaadas P, Paine M and Snead M (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000* **41**, 123-135.
- Bratel J, Jontell M, Dahlgren U and Bergenholtz G (1998). Effects of root canal sealers on immunocompetent cells in vitro and in vivo. *International Endodontic Journal* **31**, 178-188.
- Braz M, Camargo E, Saladori D, Marques M and Ribeiro D (2006). Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Journal of Oral Rehabilitation* **33**, 234-239.
- Clarke P and Allan L (2009). Cell-cycle control in the face of damage - a matter of life or death. *Trends in cell biology* **19**, 89-98.
- Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T and Schafer E (2006). A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide and two Portland Cement. *International Endodontic Journal* **39**, 213-219.
- Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O et al. (2007). Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblast. *Journal of Endodontics* **33**, 1450-1454.
- Hing KA (2005). Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2**, 184-199.
- Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y and Chang Y-C (2002). Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal* **35**, 153-158.
- Huang T-S, Ding S-J, Hsu T-C and Kao C-T (2003). Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* **24**, 3909-3913.
- Hume W (1984). The pharmacological and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *The Journal of the American Dental Association* **113**, 789-791.
- Kao S-Y, Lemoine F and Marriott S (2001). p53-independent induction of apoptosis by the HTLV-1 tax protein following UV irradiation. *Virology* **291**, 292-298.
- Kostoryz EL, Tong P, Chappelow C, Eick J, Glaros A and Yourtee D (1999). In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dental Materials* **15**, 363-373.
- Lee K-W, Williams M, Camps J and Pashley D (2002). Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. *Journal of Endodontics* **28**, 684-688.

- Macneil R and Somerman M (1993). Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *Journal of Periodontal Research* **28**, 550-559.
- Macneil R and Somerman M (1999). Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000* **19**, 8-20.
- Moghaddame-Jafari S, Mantellini M, Botero T, McDonald N and Nör J (2005). Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *Journal of Endodontics* **31**, 387-391.
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I et al. (2006). Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* **41**, 303.
- Pardo B, Gómez-González B and Aguilera A (2009). DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 1039-1056.
- Pitaru S, McCulloch C and Narayanan A (1994). Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research* **29**, 81-94.
- Ribeiro D, Duarte M, Matsumoto M, Marques M and Salvadori D (2005). Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *Journal of Endodontics* **31**, 605 -607.
- Ribeiro D, Matsumoto M, Duarte M, Marques M and Salvadori D (2006). Ex vivo biocompatibility tests on regular and white forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* **39**, 26-30.
- Seltzer S, Sinai I and August D (1970). Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. *Journal Dental Research* **49**, 332-339.
- Tai K-W and Chang Y-C (2000). Cytotoxicity evaluation of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Endodontics* **26**, 395-397.
- Valois CRA and Azevedo RB (2008). Cell-cycle deregulation induced by three different root canal sealers in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **106**, 763-767.
- Vermes I, Haanen C and Reutelingsperger C (2000). Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death. *Journal of Immunological Methods* **243**, 167-190.
- Zeichner-David M (2006). Regeneration of periodontal tissues cementogenesis revisited. *Periodontology 2000* **41**, 196-217.
- Zreiqat H, Evans P and Howlett C (1999). Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**, 389-396.

Table 1: Sealers that were tested

Type	Product	Manufacturer	Composition
Bioactive oxide	Sealer α	University of Brasilia, Brazil	Powder: oxide (CaO, SiO ₂ , P ₂ O ₅) 36%, Hexamethylenetetramine 4%, BaSO ₄ 60%. Liquid: bisphenol-A- diglycidylether 100%
Epoxy resin	Sealer 26	Dentsply, Rio de Janeiro, Brazil	Powder: Bismuth(III)oxide, calcium hydroxide, hexamethylenetetramine, titanium dioxide. Liquid: bisphenol-A- diglycidylether (Batch # 791827)
Zinc oxide- eugenol	Endofill	Dentsply, Rio de Janeiro, Brazil	Powder: zinc oxide, hydrogenated resin, (BiO ₂) ₂ CO ₃ , BaSO ₄ , Na ₂ B ₄ O ₇ . Liquid: eugenol and oil of sweet almonds (Batch # 792680)
White Portland Cement	Rejuntamento Flexível Quartzolit	Saint-Gobain Quartzolit, Brazil	Powder: white Portland cement, inorganic pigments, nontoxic chemical additives. (Batch: not identified)

Table 2: Genotoxicity of the endodontic materials at human periodontal ligament cells*

Cell DNA content				
Material	Fresh material		Set material	
	48h	72h	48h	72h
Control	490.00000	2865.66667	2919.00000	5904.66667
Endofill	9969.66667	9891.00000	9662.66667	9983.00000
Sealer 26	2999.00000	4952.33333	6575.33333	7664.66667
Sealer α	1650.00000	9707.00000	1045.00000	4965.66667
W. Portland cement	2208.33333	5726.00000	8171.00000	9135.33333

* Root square of mean at cell DNA content

Table 3: Cell cycle changes in pdl cells after contact with endodontic material extract*

Fresh Material						
Material	Phase G1		Phase S		Phase G2/M	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Control	70.5063131	67.4641832	48.8999968	36.1424235	42.7467997	33.0771298
Endofill	3.2724459	8.2578908	2.1842309	2.9213721	0.9106836	3.4773577
Sealer 26	72.5168561	60.0117389	27.1043493	30.5777062	30.4872702	18.8858144
Sealer α	86.3509273	9.1241589	14.8125711	8.4527793	25.6479931	1.3333333
WPc**	76.6253541	51.3802689	27.8926053	26.9394404	29.5336360	28.7598999
Set Material						
Material	Phase G1		Phase S		Phase G2/M	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Control	84.1431336	63.8421667	34.1748665	20.7468566	34.3708217	18.3066798
Endofill	8.7354043	4.1143990	4.0832271	1.8652514	2.2954498	1.2167605
Sealer 26	58.3716375	48.3711889	19.9299832	16.1653359	23.5795688	4.0986557
Sealer α	81.8348213	57.5466653	24.8963056	15.3996267	32.9124519	13.7423574
WPc**	42.7490358	27.1580547	25.7257009	10.2902560	18.2467736	2.8671799

* Root square of mean at cell cycle phases

** White Portland cement

Figure 1: DNA damage of the human PDL cells 24 h after the addition of root perforation repair material extract. Graph A represents fresh material, and Graph B represents set materials.

Figura 2: The effects of endodontic materials' eluates at different states (fresh and set materials) on cell DNA content.

Figure 3: Cell cycle changes in PDL cells 24 h after the addition of root perforation repair material extract. Graphs A, C and E represent fresh material and graphs B, D and F represent set material.

Figure 4: The effect of endodontic materials' eluates on cell-cycle. Graph A represents fresh material and Graph B represents set material. Endofill did not represented because it caused excessive cell death.