

**U. PORTO**



**FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Dissertação de Investigação  
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**Biocompatibilidade *in vitro* de um novo cimento endodóntico**

Tiago de Oliveira Simões Pereira

**Orientador**

**Prof. Dr. Manuel José Fontes de Carvalho**

**Co-Orientador**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Irene Graça Azevedo Pina Vaz**

Porto 2011

# **Biocompatibilidade *in vitro* de um novo cimento endodóntico**

Tiago de Oliveira Simões Pereira \*

2011

Dissertação de investigação realizada no âmbito da unidade curricular  
“Monografia de investigação/relatório de actividade clínica”

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Fontes de Carvalho

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Irene Graça Azevedo Pina Vaz

\* Estudante do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto,

Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393, Porto

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Dr. Manuel José Fontes de Carvalho e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Irene Graça Azevedo Pina Vaz a sua inestimável generosidade, orientação e disponibilidade que permitiram a realização do trabalho conducente a esta dissertação. Agradeço também à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Raposo Fernandes, directora do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da FMDUP, a cedência de instalações, materiais e equipamentos, bem como aos restantes membros do laboratório, em particular, ao Prof. Dr. João Miguel da Costa Rodrigues, pelo seu precioso apoio técnico e científico e inesgotável disponibilidade.

# Índice

Resumo .....	1
Palavras-Chave .....	1
Introdução .....	2
Materiais e Métodos .....	4
Preparação e extracção dos cimentos endodonticos .....	4
Culturas Celulares .....	5
MG63 .....	5
Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano.....	5
Co-culturas MG63-PBMC .....	6
Exposição das Culturas Celulares aos Extractos .....	6
Viabilidade Celular .....	7
Actividade da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (FATR) .....	7
Marcação Citoquímica da FATR .....	7
Marcação Imunocitoquímica .....	8
Determinação da Reabsorção de Fosfato de Cálcio.....	8
Análise Estatística.....	8
Resultados.....	10
Viabilidade Celular .....	10
Actividade da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (FATR) .....	13
Marcação Citoquímica da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente .....	16
Marcação Imunocitoquímica da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente.....	18
Reabsorção de Fosfato de Cálcio.....	18
Discussão .....	21
Conclusões.....	24
Referências .....	25

## Resumo

O sucesso da terapia endodontica depende da obturação adequada dos espaços pulpare, os quais devem ser preenchidos e selados de forma a assegurar o isolamento entre a cavidade oral, o interior do dente e os tecidos perirradiculares. Muitas das técnicas empregues actualmente recorrem a um material nuclear sólido e um cimento endodontico, o qual deverá ser, para além de um bom selante, biologicamente inerte. A biocompatibilidade dos cimentos endodonticos é especialmente importante dado o tempo de permanência espectável do material no organismo, as consequências clínicas da irritação crónica dos tecidos perirradiculares e a proximidade que muitas vezes se verifica entre o limite da obturação e lesões intra-ósseas. Assim, a biocompatibilidade dos cimentos endodonticos deverá ser sempre extensamente estudada, particularmente quando se trata de um novo material. Neste trabalho visámos aferir a biocompatibilidade de um novo cimento endodontico de quitosano, óxido de zinco e eugenol *in vitro*, tendo avaliado a sua citotoxicidade sobre células MG63, com um perfil fenotípico similar a osteoblastos, e o seu efeito sobre a diferenciação e actividade osteoclástica em co-culturas de células MG63 e monócitos de sangue periférico, os quais demonstram características osteoclásticas após um período de diferenciação. Determinámos que apesar de demonstrar potencial citotóxico, os efeitos deletérios do novo cimento endodontico sobre a viabilidade celular são menos pronunciados que os do cimento de óxido de zinco-eugenol tradicional, bem como sobre a diferenciação e actividade osteoclástica, pelo que concluímos que o novo cimento endodontico apresenta um perfil de biocompatibilidade mais favorável que o cimento de óxido de zinco-eugenol e consideramos que poderá constituir um novo material médico-dentário.

## Palavras-Chave

Quitosano, óxido de zinco-eugenol, cimento endodontico, citotoxicidade, biocompatibilidade, MG63, PBMC.

## Introdução

O sucesso da terapia endodontica requer uma remoção eficaz dos conteúdos e focos de infecção pulpaes, bem como a apropriada assepsia e obturação dos espaços previamente ocupados pela polpa dentária. Por sua vez, uma obturação adequada depende da sua capacidade de preencher e selar aqueles espaços, impedindo a infiltração por fluidos e a colonização bacteriana, proporcionando um isolamento adequado entre a cavidade oral, o interior do dente e os tecidos perirradiculares.<sup>1</sup> De facto, o sucesso da terapia endodontica depende em grande parte da qualidade da obturação realizada, razão pela qual a selecção do material obturador, para além da técnica empregue na sua aplicação, se revela tão importante.<sup>2</sup>

Muitas das técnicas de obturação utilizadas actualmente recorrem ao preenchimento dos canais radiculares com cones de gutta-percha e cimentos endodonticos, os quais devem ser, para além de bons materiais de isolamento, biologicamente inertes, isto é, devem ser bem tolerados local e sistemicamente. Na realidade, a biocompatibilidade dos materiais dentários é fundamental para o sucesso clínico e para a segurança biológica dos doentes nos quais são empregues. Num cimento endodontico esta propriedade é ainda mais importante, na medida em que este material, na maior parte dos casos, permanece em contacto, directo ou indirecto, com os tecidos periapicais do dente tratado enquanto este permanecer no seu alvéolo. Por outro lado, este material é muitas vezes utilizado na proximidade de uma lesão intra-óssea activa, pelo que a eventual irritação tecidual poderá induzir a sua progressão ou retardar a sua regressão.<sup>3,4</sup> Assim, a biocompatibilidade dos cimentos endodonticos deverá ser sempre extensamente estudada, particularmente quando se trata de um novo material.

Neste trabalho, visámos aferir a biocompatibilidade de um novo cimento endodontico, composto por quitosano de baixo peso molecular, óxido de zinco e eugenol, em cultura celular. O quitosano é um copolímero biodegradável composto por cadeias de  $\beta$ -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopirranose e  $\beta$ -(1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucopirranose, obtido através do processamento químico ou enzimático da quitina, um polissacarídeo natural encontrado no exosqueleto de crustáceos marinhos, fungos e insectos.<sup>5-7</sup> Nas últimas décadas, o quitosano e seus derivados têm sido amplamente empregues no desenvolvimento de novos fármacos e dispositivos biomédicos<sup>5,6</sup>,

incluindo a sua aplicação como infra-estrutura na regeneração de tecidos<sup>9</sup>, bem como no revestimento da superfície de implantes dentários.<sup>10</sup>

As diversas aplicações do quitosano no campo da Medicina devem-se às suas favoráveis propriedades químicas, físicas e biológicas, particularmente, às elevadas biocompatibilidade, actividade antibacteriana e biodegradabilidade.<sup>5-8</sup> Não obstante, as propriedades da sua associação com óxido de zinco e eugenol como cimento endodontico permanecem por avaliar, particularmente a sua biocompatibilidade, razão de ser deste trabalho.

A biocompatibilidade dos cimentos endodonticos tem sido avaliada através de diversos sistemas experimentais, designadamente, através de estudos em culturas celulares<sup>11-19</sup>, mas também em modelos animais<sup>3,20-22</sup> e em modelos humanos.<sup>24</sup> Nos estudos *in vitro* publicados, são geralmente utilizadas linhas celulares e/ou culturas primárias de células com origem no tecido conjuntivo ou ósseo, designadamente, fibroblastos e osteoblastos, ou células imunitárias, particularmente, macrófagos. Neste trabalho, utilizámos culturas de uma linha celular de osteossarcoma humano (MG63) – *osteoblast-like cells* – bem como, co-culturas de células MG63 e células mononucleares de sangue periférico humano, que integram células progenitoras de osteoclastos.<sup>25</sup> Avaliámos a citotoxicidade do novo cimento endodontico sobre as células MG63, através do ensaio de MTT, que afere a actividade metabólica celular, e a osteoclastogénese, aferida nas co-culturas pela determinação qualitativa de marcadores moleculares de diferenciação osteoclástica e pela avaliação da actividade funcional dos osteoclastos.

## Materiais e Métodos

### Preparação e extração dos cimentos endodônticos

Os cimentos endodônticos, quitosano-óxido de zinco-eugenol (QOE) e óxido de zinco-eugenol (OZE), foram espatulados à temperatura ambiente sobre placa de vidro com espátula de aço inoxidável até à completa homogeneização. O quitosano (Heppe Biomaterial GmbH, Landsberg, Alemanha), na forma de pó, caracteriza-se por um peso molecular entre 10 e 50 kDa e um grau de desacetilação de 90%. O óxido de zinco (OZ), na forma de pó, e o eugenol, na forma de líquido, provieram do fabricante Produits Dentaires SA (Vevey, Suíça). A proporção utilizada dos componentes para cada tipo de cimento foi a seguinte: 1) QOE – pó de OZ, 75% (p/p), quitosano, 25% (p/p), e eugenol, na proporção pó-líquido de 2,5:1 (p/v em g/mL); 2) OZE – pó de OZ e eugenol, na proporção pó-líquido de 2,5:1 (p/v em g/ml).

A preparação dos cimentos decorreu em duas fases, separadas por 24h. Na primeira, cada cimento foi fraccionado em amostras imediatamente após a sua espatulação, com aproximadamente 0,8 g. Estas foram colocadas sobre parafilme (*Pechinery Plastic Packaging*, Chicago, EUA), acondicionadas em caixas de Petri plásticas (Orange Scientific, Bélgica) seladas com parafilme e mantidas durante 24h numa estufa a 37°C. Na segunda fase, procedeu-se a nova preparação dos dois cimentos e fraccionamento em amostras com aproximadamente 0,8 g que foram colocadas sobre parafilme. Seguidamente, cada amostra preparada na primeira e segunda fases foi, separadamente, completamente submergida em 8 mL de meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Gibco, Reino Unido) sem soro num tubo plástico de centrifuga com 15 mL de capacidade. A relação percentual peso/volume entre amostras e meio de cultura sem soro (veículo de extração) foi sempre de 10 % (% g/mL), tendo-se procedido, quando necessário, à correcção do volume para manter esta proporção.

Todos os tubos contendo veículo de extração e amostras foram mantidos numa estufa a 37°C durante 24h. Metade destes foi sujeita a agitação contínua sobre um agitador de rolos (extração dinâmica) durante este período, enquanto a outra metade foi mantida imóvel num suporte de tubos (extração estática). Um tubo de centrifuga adicional, contendo apenas meio de cultura sem soro, foi sujeito às mesmas condições de extração dinâmica (controlo negativo). As condições de preparação e extração das amostras estão resumidas na tabela 1.

**Tabela I - Condições de Preparação e Extração das Amostras de Cimento Endodôntico**

Amostra	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
<b>Cimento</b>	QOE	QOE	QOE	QOE	OZE	OZE	OZE	OZE
<b>Preservação</b>	0h	0h	24h	24h	0h	0h	24h	24h
<b>Extração</b>	Dinâmica	Estática	Dinâmica	Estática	Dinâmica	Estática	Dinâmica	Estática

**Legenda:** QOE, cimento de quitosano, óxido de zinco e eugenol. OZE, cimento de óxido de zinco-eugenol. Presa: amostra submetida a extração imediatamente após a sua preparação (0h) ou após 24h a 37°C (24h).

No final do processo de extração, o conteúdo líquido de cada tubo foi separadamente filtrado com filtros de seringa Furadisc FP de 0,2 (Whatman, Reino Unido) sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar vertical Biosafe 2 (Ehret GmbH & Co. KG, Alemanha), transferido para um novo tubo de centrifuga e mantido a -20°C até ser utilizado. Todo o processo de preparação e extração das amostras de cimentos endodônticos seguiu o estipulado na norma ISO 10993-12:2007.

## Culturas Celulares

### MG63

As células *osteoblast-like* da linha celular MG63 foram semeadas a uma densidade inicial de  $10^4$  células por poço ( $0,37 \text{ cm}^2$ ) em placas de cultura de 96 poços (Orange Scientific, Bélgica) com meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Gibco, Reino Unido) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 IU/ml penicilina, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  estreptomicina, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  anfotericina B e 50  $\mu\text{g/ml}$  ácido ascórbico, 24h antes da exposição aos extractos. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera humidificada, com 5%  $\text{CO}_2$  e a 37°C.

### Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano foram isoladas do sangue de doadores saudáveis do sexo masculino com 25-35 anos. O sangue foi diluído 1:2 em PBS (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7,4) e transferido para um tubo de

centrífuga com Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences, EUA). A amostra foi centrifugada a 400g durante 30 minutos e, após a centrifugação, as PBMC foram colhidas na interface entre o Ficoll-Paque e o PBS e lavadas duas vezes com PBS. Em média, por cada 100 mL de sangue processado foram obtidas cerca de  $70 \times 10^6$  PBMC.

### **Co-culturas MG63-PBMC**

As células da linha celular MG63 foram incubadas em placas de cultura (Orange Scientific, Bélgica) com meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Gibco, Reino Unido) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 IU/ml penicilina, 2,5  $\mu$ g/ml estreptomicina, 2,5  $\mu$ g/ml anfotericina B e 50  $\mu$ g/ml ácido ascórbico até atingirem cerca de 70-80% de confluência. Foram, então, destacadas por digestão enzimática com 0,05% de tripsina e 0,5 mM EDTA, ressuspendidas no mesmo meio de cultura, semeadas a uma densidade de  $10^3$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 96 poços e mantidas em atmosfera humidificada, com 5% CO<sub>2</sub> e a 37°C. Após 24h, as PBMC foram adicionadas à cultura a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> e as co-culturas foram mantidas por 21 dias em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 30% de soro humano do sangue do mesmo dador correspondente ao isolamento, 100 IU/ml penicilina, 2,5  $\mu$ g/ml estreptomicina, 2,5  $\mu$ g/ml anfotericina B e 2 mM de L-glutamina. As células foram mantidas em atmosfera humidificada, com 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C e o meio de cultura substituído a cada semana.

### **Exposição das Culturas Celulares aos Extractos**

As células foram expostas a extracto não diluído e/ou a 4 diluições sucessivas deste. Nas experiências de viabilidade celular as células foram incubadas com extracto não diluído e 4 diluições com os factores: 2, 4, 8 e 16. Cada condição de preparação do cimento, extracção (tabela 1) e diluição foi testada em quadruplicado. Nas experiências destinadas a avaliar a actividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR) e de marcação citoquímica e imunocitoquímica, as células foram expostas a 4 diluições dos extractos originais com os factores de diluição 4, 16, 64 e 256. Cada diluição foi testada em triplicado na determinação da actividade da FATR e em duplicado nas marcações citoquímica e imunocitoquímica. Finalmente, nas experiências destinadas a avaliar a actividade de reabsorção dos osteoclastos, as células foram incubadas com uma diluição dos extractos originais com um factor de diluição de 64. Para todas as condições de exposição, foram incubadas células, com o mesmo número de réplicas,

com meio de cultura sujeito ao mesmo processo de extração que os extractos, mas na ausência de qualquer cimento, servindo como controlo negativo

## **Viabilidade Celular**

A viabilidade das células MG63 foi determinada através do ensaio de redução do MTT após diferentes tempos de exposição das culturas celulares aos extractos (0h, 24h e 72h). As células foram incubadas durante 4h a 37°C na presença de 0,5 mg/ml de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). De seguida, em cada poço das placas de cultura celular, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazano solubilizados em 100 µl de dimetilsulfóxido. A absorvância das amostras a 550 nm foi determinada num leitor de ELISA Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Vermont, EUA).

## **Actividade da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (FATR)**

A actividade enzimática da FATR foi determinada pelo ensaio de hidrólise do *para*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) após diferentes tempos de exposição das culturas celulares aos extractos (7, 14 e 21 dias). As células foram lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas com Triton X-100 a 0,1% (v/v). Procedeu-se, então, à incubação com solução de *p*NPP a 12,5 mM, ácido tartárico (0,04 M) e citrato (0,09 M), pH 4,8, durante uma hora a 37°C. A reacção foi parada por adição de NaOH 5 M e a absorvância medida a 400 nm num leitor de ELISA Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Vermont, EUA). Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em nmol/min e normalizados para o conteúdo total de proteína nas culturas (nmol/min.mg<sup>-1</sup>).

## **Marcação Citoquímica da FATR**

As células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com formaldeído a 3,7% durante 15 minutos. As células foram lavadas duas vezes com água destilada e a FATR marcada com o *kit Acid Phosphatase, Leucocyte* (TRAP) (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram incubadas com naftol AS-BI a 0,12 mg/mL, na presença de tartarato a 6,76 mM e Fast Garnet GBC a 0,14 mg/mL, durante uma hora a 37°C no escuro. De seguida, as células foram lavadas e marcadas com hematoxilina. As células

multinucleadas marcadas para a FATR foram visualizadas e contadas com o auxílio de um microscópio Nikon TMS (Nikon Instruments Inc., EUA).

### **Marcação Imunocitoquímica**

As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 3,7% (v/v) formaldeído durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, lavaram-se as células duas vezes com PBS e permeabilizaram-se durante 5 minutos com 0.1% (v/v) Triton X-100. As culturas celulares foram marcadas para a actina com 5 U/mL Alexa Fluor® 647-Faloidina (Invitrogen, EUA), e para o receptor da vitronectina (VNR) e receptor da calcitonina (CTR) com 50µg/mL IgGs de rato anti-VNR e anti-CTR (R&D Systems, EUA), respectivamente. A detecção das IgGs anti-VNR e anti-CTR foi efectuada com 2µg/ml IgGs anti-rato marcados com Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, EUA). As culturas celulares foram visualizadas por Microscopia Confocal.

### **Determinação da Reabsorção de Fosfato de Cálcio**

As co-culturas de PBMC e células MG63 foram estabelecidas e mantidas durante 21 dias, da forma descrita anteriormente, sobre placas de cultura *BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture Plates* (BD Biosciences, EUA) – poços de cultura com o fundo revestido por um filme de fosfato de cálcio. As células foram lixiviadas com NaOCl a 6% e NaCl a 5,2% e as camadas remanescentes do filme de fosfato de cálcio visualizadas num microscópio óptico de contraste de fase. As lacunas de reabsorção foram identificadas e a correspondente área quantificada em 8 imagens seleccionadas aleatoriamente em cada poço de cultura com o auxílio do programa informático ImageJ 1.41.

### **Análise Estatística**

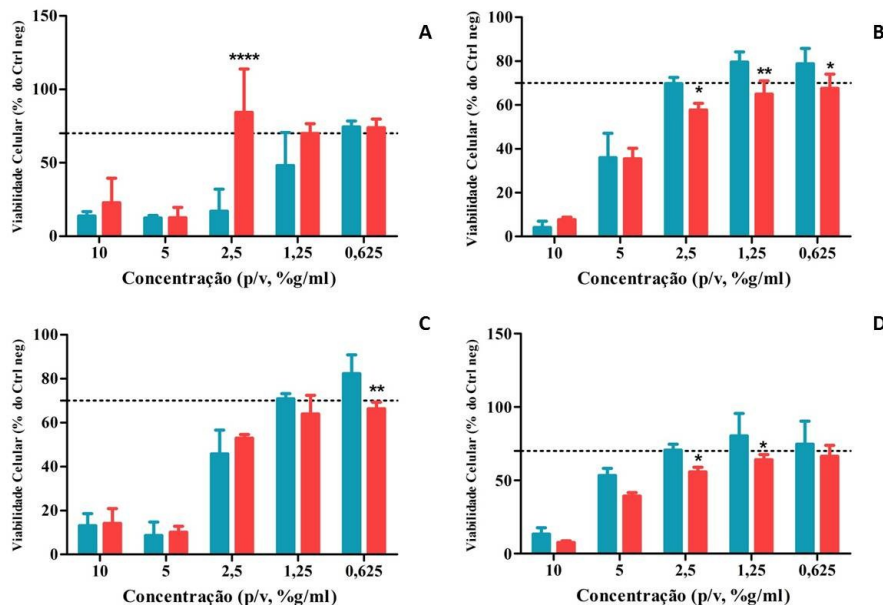
Os resultados quantificados são apresentados como valores médios  $\pm$  desvio padrão e são representativos de três replicados para os ensaios de viabilidade celular e actividade da FATR, ou de dois replicados, para a marcação citoquímica da FATR. Os resultados referentes à reabsorção de fosfato de cálcio resultam de uma única observação. Para determinar o significado estatístico das diferenças entre os valores médios, procedeu-se à análise de variância (*two-way*

ANOVA), tendo-se complementado a análise através do teste de Bonferroni de comparações múltiplas. As comparações foram realizadas entre valores médios emparelhados para as mesmas condições experimentais, diferindo apenas para o factor “cimento endodóntico” ou “preparação do cimento”. As diferenças entre valores médios foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor determinado de  $P$  foi inferior a 0,05. Comparações entre apenas dois grupos de valores foram realizadas com recurso ao teste de Mann-Whitney. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, EUA).

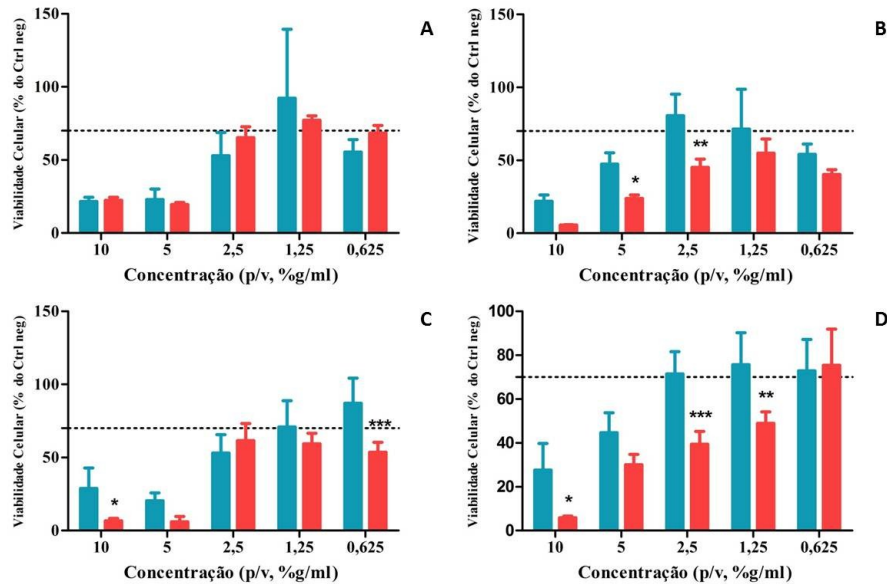
## Resultados

### Viabilidade Celular

Os resultados do ensaio de redução do MTT em culturas de células MG63 demonstram, claramente, que tanto o cimento de óxido de zinco-eugenol (OZE) como o de quitosano-óxido de zinco-eugenol (QOE) têm um efeito citotóxico nas culturas celulares testadas. Nas figuras 1 e 2 pode-se verificar que para ambos os períodos de exposição testados ocorreu uma diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração dos extractos (figura 3). De facto, a exposição das células aos extractos não diluídos (10%) traduziu-se numa acentuada diminuição da viabilidade celular relativamente ao controlo, sendo este efeito significativamente atenuado com a crescente diluição dos extractos. Na realidade, se tomarmos como valor de referência 70% da viabilidade celular observada nas culturas de controlo como limiar do potencial de citotoxicidade das substâncias testadas, em conformidade com a norma ISO 10993-5:2009, podemos verificar que a generalidade dos extractos não apresenta toxicidade significativa quando diluídos 1:16 (0,625%). Esta tendência foi observada para todas as condições de preparação e extração dos cimentos endodônticos testadas.



**Figura 1** - Viabilidade celular determinada por ensaio de redução de MTT. As culturas de células MG63 foram expostas durante 24 horas a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: extração dinâmica (A) e estática (B) imediatamente após preparação do cimento, extração dinâmica (C) e estática (D) após presa de 24h a 37°C. Todos os valores são apresentados como percentagens dos valores obtidos para o controlo negativo. Legenda: Barras azuis, QOE, Barras vermelhas, OZE, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

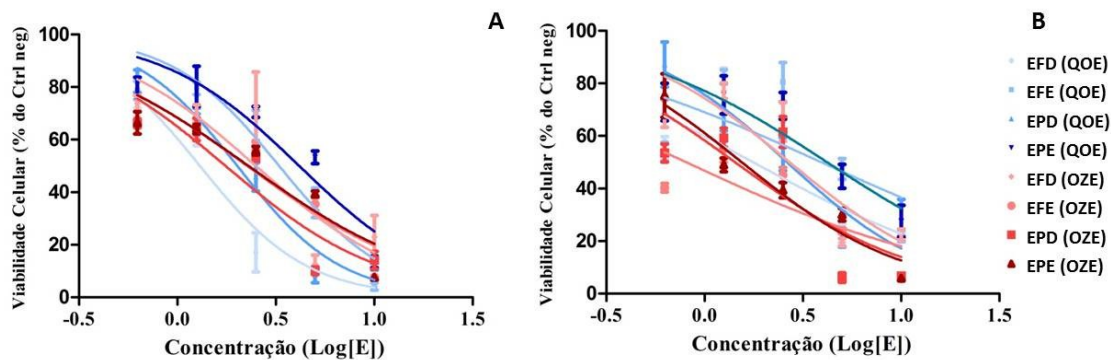


**Figura 2** - Viabilidade celular determinada por ensaio de redução de MTT. As culturas de células MG63 foram expostas durante 72 horas a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: extração dinâmica (A) e estática (B) imediatamente após preparação do cimento, extração dinâmica (C) e estática (D) após presa de 24h a 37°C. Todos os valores são apresentados como percentagens dos valores obtidos no mesmo dia para o controlo negativo. Legenda: Barras azuis, QOE, Barras vermelhas, OZE, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

Quando comparámos entre si os resultados obtidos para cada cimento, emparelhados para as mesmas condições de preparação e extração, verificámos que o QOE é sempre, com uma única excepção, menos tóxico ou apresenta a mesma toxicidade que o OZE, tanto ao fim de 24h como 72h de exposição celular. A única excepção diz respeito aos resultados obtidos para a concentração 2,5%, no final de uma exposição de 24 horas, com cimento extraído imediatamente após a preparação (figura 1, gráfico A). Neste caso, comparando com os resultados obtidos para o OZE, verifica-se que o valor de viabilidade celular obtido não se conforma à tendência observada para os extractos preparados sob as mesmas e restantes condições. De facto, à diluição testada (1:4, 2,5%) corresponde um valor médio de viabilidade celular superior ao que se observa para as diluições superiores (1:8 e 1:16), bem como um amplo desvio padrão, pelo que o resultado se poderá dever a um erro experimental não identificado e não deverá ser considerado na apreciação da tendência.

A maior toxicidade do OZE relativamente ao QOE é particularmente bem demonstrada nos resultados patentes no gráfico B da figura 1, no qual se verifica um efeito diferencial estatisticamente significativo para a exposição celular aos extractos durante 24 horas com as três concentrações mais baixas. Esta tendência é corroborada

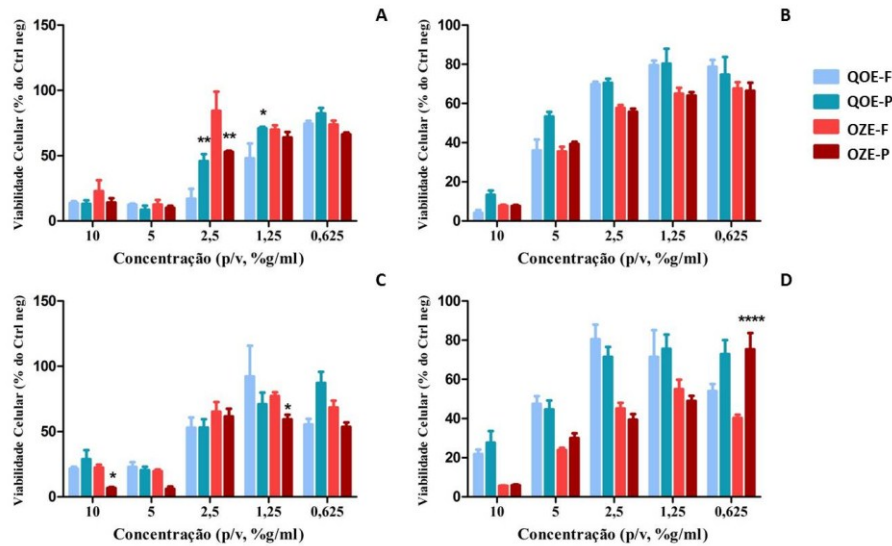
pelos resultados obtidos com as restantes condições de preparação e extracção do cimento para o mesmo período de exposição, obtendo-se uma diferença estatisticamente significativa em todos os casos, excepto no que foi salientado anteriormente (figura 1, gráfico A). Verifica-se o mesmo com os resultados correspondentes à exposição celular durante 72 horas. De facto, também nestas condições o cimento preparado com quitosano é sempre menos tóxico ou apresenta a mesma toxicidade que o OZE para todas as concentrações testadas (figura 2).



**Figura 3** - Curvas concentração-resposta: Gráficos representativos do efeito da concentração dos extractos sobre a viabilidade das células MG63. Células expostas durante 24h (A) ou 72h (B) a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: 1) extração dinâmica (EFD) e estática (EFE) imediatamente após preparação do cimento, extração dinâmica (EPD) e estática após presa de 24h a 37°C (EPE). Todos os valores são expressos em percentagem dos valores obtidos no mesmo dia para o controlo negativo (média  $\pm$  SEM).

Quando comparados os resultados obtidos para as diferentes condições de preparação de cada cimento, isto é, extração realizada imediatamente após a preparação do cimento e extração após 24h de presa a 37°C, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas quanto ao efeito dos extractos preparados por extração dinâmica (figura 4). De facto, nestes casos, a análise de variância demonstrou um efeito diferencial, tanto com extractos preparados a partir de QOE como de OZE. No primeiro caso, os resultados obtidos após exposição celular de 24h parecem indicar que a extração realizada imediatamente após a preparação do cimento resulta numa maior toxicidade dos extractos (figura 4, gráfico A). Contudo, os resultados obtidos após exposição celular de 72h, não manifestam tendência análoga (figura 4, gráfico C).

No caso do OZE, a tendência parece ser a inversa, isto é, a extração de amostras de cimento após a presa de 24h a 37°C parece resultar numa maior toxicidade



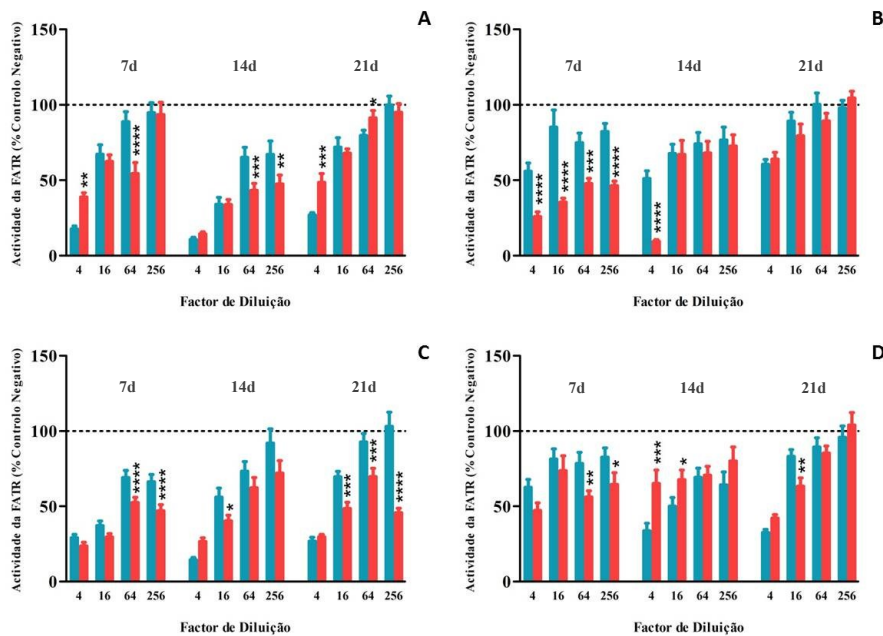
**Figura 4** - Efeito das condições de preparação dos cimentos endodônticos sobre a viabilidade celular. As culturas de células MG63 foram expostas durante 24 ou 72 horas a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: exposição celular de 24h – extração dinâmica (A) e estática (B). Exposição celular de 72h, extração dinâmica (C) e estática (D). Todos os valores são expressos como percentagem do respectivo controlo negativo. Legenda: F, extração realizada imediatamente após a preparação do cimento, P, extração realizada após presa do cimento durante 24h a 37 °C, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

dos extractos, tanto após 24 como 72 horas de exposição. Por outro lado, os resultados obtidos com os extractos preparados por extração estática, tanto de QOE como OZE, não evidenciam qualquer diferença imputável ao procedimento de preparação da amostra. De facto, com uma única excepção, a análise de variância demonstrou a ausência de diferença com significado estatístico quando comparados os dois procedimentos de preparação do mesmo cimento nestas condições de extração (figura 4, gráfico D).

### Actividade da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (FATR)

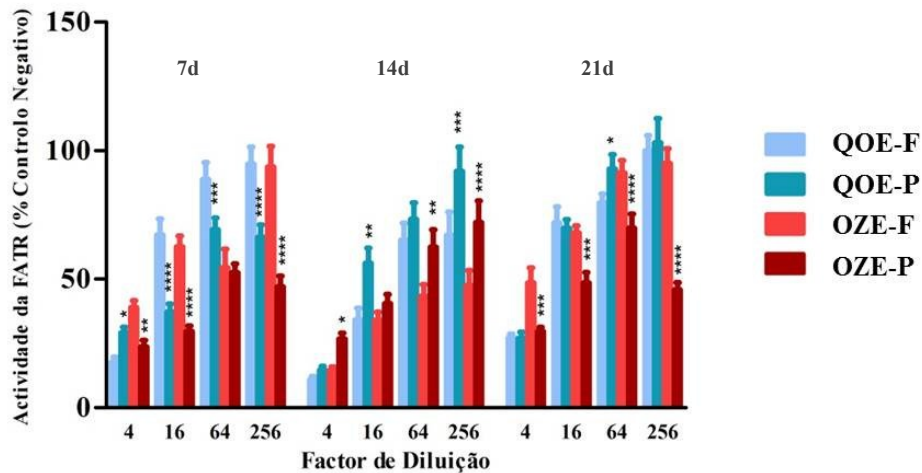
A actividade da enzima FATR foi determinada nas co-culturas MG63-PBMC após 7, 14 e 21 dias de exposição aos extractos obtidos dos cimentos de QOE e OZE. Em termos gerais, os resultados obtidos demonstram uma tendência para a redução da actividade enzimática com a exposição aos extractos. Este efeito é atenuado com a crescente diluição dos extractos, observando-se uma actividade da FATR próxima da do

controlo negativo na generalidade das condições experimentais para as diluições dos extractos 1:64 e 1:256 (figura 5). Por outro lado, a exposição celular aos extractos com a menor diluição (1:4) traduz-se, ao fim de 7 dias de exposição celular, numa diminuição média da actividade enzimática para  $37,73 \pm 16,24$  % da observada nas culturas de controlo para o mesmo período. A exposição aos extractos durante 14 dias está associada com uma diminuição mais acentuada ( $28,27 \pm 20,54$  %) e a exposição durante 21 dias, com uma diminuição menor ( $41,44 \pm 14,94$  %).



**Figura 5** - Efeito da exposição celular aos extractos sobre a actividade da FATR. As co-culturas de células MG63 e PBMC foram expostas durante 7, 14 ou 21 dias a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: extracção dinâmica (A) ou estática (B), imediatamente após preparação do cimento, ou extracção dinâmica (C) ou estática (D), após presa de 24h a 37°C. Todos os valores são expressos em percentagem dos valores do controlo negativo. Legenda: Barras azuis, QOE, Barras vermelhas, OZE, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

Quando comparamos os resultados obtidos com QOE e OZE, verificamos que, apenas com excepções pontuais, a exposição aos extractos de OZE se traduz numa maior diminuição da actividade enzimática do que a exposição aos extractos de QOE. De facto, a actividade da FATR nas culturas celulares expostas a extractos de QOE é, genericamente, superior ou igual à que se observa nas culturas expostas a extractos de OZE. Este efeito diferencial encontra-se bem representado no gráfico B da figura 5, onde podemos observar que a actividade enzimática nas culturas expostas durante 7 dias aos extractos de QOE é sempre superior à que se observa nas culturas expostas a



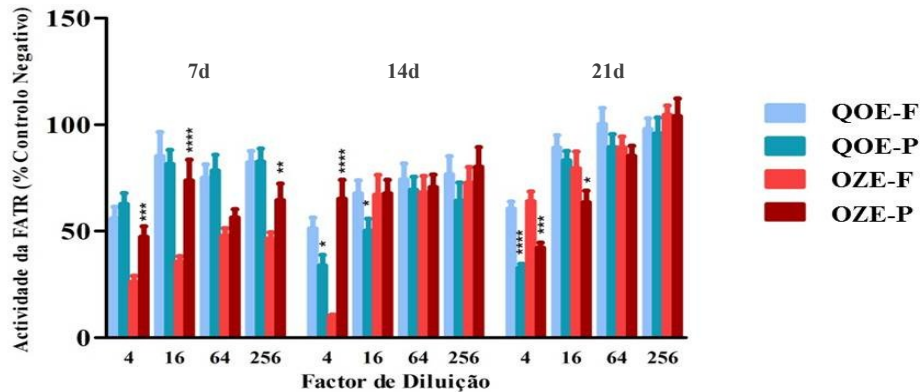
**Figura 6** - Efeito das condições de preparação dos cimentos sobre a actividade da FATR. As co-culturas MG63-PBMC foram expostas durante 7, 14 e 21 dias a 5 concentrações dos extractos obtidos dos cimentos endodônticos por extracção dinâmica. Legenda: F, extracção imediatamente após a preparação do cimento, P, extracção após presa do cimento durante 24h a 37°C, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni). Todos os valores são expressos como percentagens dos valores para o correspondente controlo negativo.

extractos de OZE para o mesmo período de tempo. Nos restantes tempos de exposição, não se observa qualquer diferença significativa entre o efeito de um cimento ou do outro. A análise dos resultados revela ainda que, pontualmente, a actividade da FATR é superior nas culturas expostas a extractos obtidos de OZE. De facto, observamos uma diferença estatisticamente significativa nas culturas expostas durante 14 dias às diluições 1:4 e 1:16 dos extractos obtidos de amostras de cimento após presa de 24h a 37 °C, por extracção estática, bem como, nas culturas expostas durante 7 e 21 dias à diluição 1:4 dos extractos preparados por extracção dinâmica imediatamente após a preparação dos cimentos. Nas restantes condições experimentais, a actividade enzimática associada com a exposição aos extractos de QOE é superior ou não apresenta diferença estatisticamente significativa relativamente aos valores obtidos para os extractos de OZE.

A análise de variância (*two-way* ANOVA) demonstra um efeito significativo do factor cimento endodôntico sobre os resultados obtidos após a exposição aos extractos durante 7 e 14 dias. Por outro lado, os resultados obtidos após 21 dias de exposição celular a extractos obtidos por extracção estática não demonstram estatisticamente diferenças entre os cimentos.

A análise dos resultados obtidos para as diferentes condições de preparação de cada cimento, isto é, extracção realizada imediatamente após a preparação do cimento e extracção após 24h de presa a 37° C, revelou diferenças estatisticamente significativas

quanto ao efeito dos extractos preparados por extracção dinâmica e estática (figuras 6 e 7). No entanto, não se constata uma tendência geral, relativo a um ou outro cimento, que perpassa os diferentes períodos de exposição celular analisados e as diferentes condições de extracção.



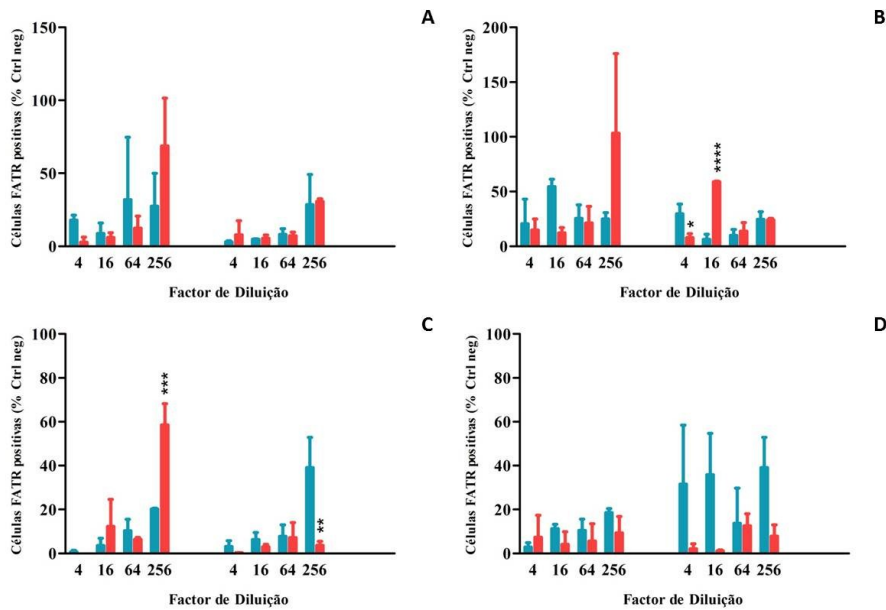
**Figura 7** - Efeito das condições de preparação dos cimentos sobre a actividade da FATR. As co-culturas MG63-PBMC foram expostas durante 7, 14 e 21 dias a 5 concentrações dos extractos obtidos dos cimentos endodonticos por extracção estática. Legenda: F, extracção imediatamente após a preparação do cimento, P, extracção após presa do cimento durante 24h a 37°C, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (two-way ANOVA com post-test Bonferroni). Todos os valores são apresentados como percentagens dos obtidos para o correspondente controlo negativo.

## Marcação Citoquímica da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

A marcação citoquímica para a FATR nas co-culturas MG63-PBMC revelou que a exposição celular aos extractos obtidos dos cimentos endodonticos se traduz numa diminuição do número de células a expressar a enzima. De facto, em quase todas as condições experimentais analisadas se observou que nas culturas expostas aos extractos, o número de células positivas para a FATR foi sempre inferior ao observado nas correspondentes culturas de controlo (figura 8). A única excepção diz respeito às células expostas a um extracto de OZE, obtido por extracção estática realizada imediatamente após a preparação do cimento, diluído em meio de cultura por um factor de 256 (figura 8, gráfico B). Na realidade, a exposição a extractos diluídos por este factor, sob todas as

condições experimentais, resulta nas contagens mais elevadas de células com marcação para a FATR.

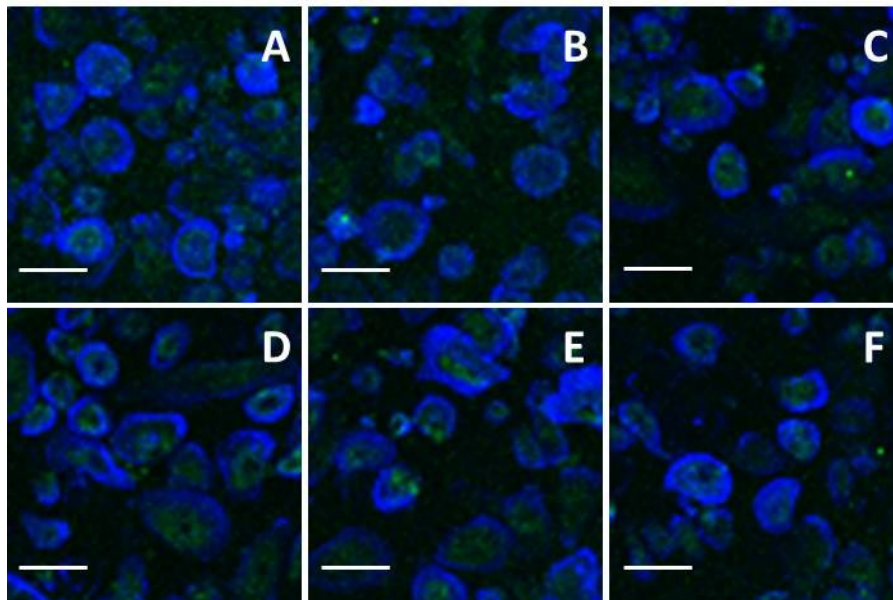
A análise de variância revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os efeitos dos extractos dos cimentos em algumas das condições experimentais, designadamente, após exposição de 14 e 21 dias a extractos obtidos por extracção dinâmica após a presa e após exposição de 21 dias a extractos obtidos por extracção estática realizada imediatamente após a preparação do cimento (figura 8, gráficos B e C). Contudo, não se distingue uma tendência subjacente nem tão pouco se observam resultados consistentes entre diferentes ou sob as mesmas condições experimentais. A esta conclusão não será alheia a elevada variabilidade patente nos resultados obtidos.



**Figura 8** - Efeito da exposição celular aos extractos sobre o número de células a expressar FATR. As co-culturas de células MG63 e PBMC foram expostas durante 14 ou 21 dias a 5 concentrações de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: extração dinâmica (A) ou estática (B) imediatamente após preparação do cimento, ou extração dinâmica (C) ou estática (D) após presa de 24h a 37°C. Todos os valores são expressos como percentagens dos valores obtidos o controlo negativo. Legenda: 14d e 21d, exposição celular de 14 ou 21 dias, Barras azuis, QOE, Barras vermelhas, OZE, \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001 (two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

## Marcação Imunocitoquímica da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

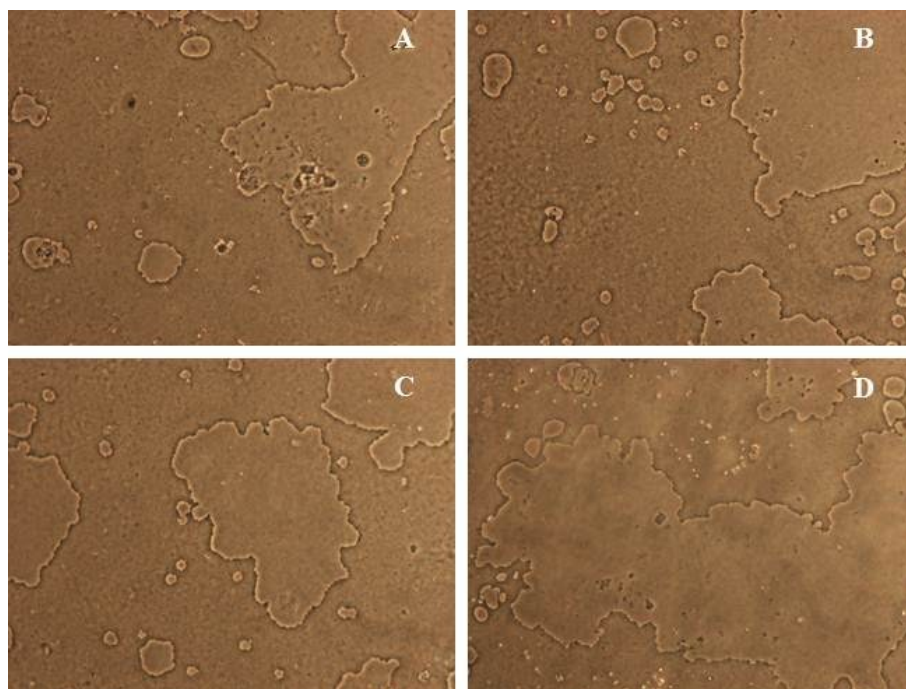
A figura 9 apresenta imagens representativas das co-culturas MG63-PBMC onde se pode observar a presença de anéis de actina, a azul, e dos marcadores osteoclásticos VNR e CTR, a verde. A marcação imunocitoquímica demonstrou uma densidade celular, aparentemente, análoga à que se observou para a marcação da FATR para a mesma diluição dos extractos.



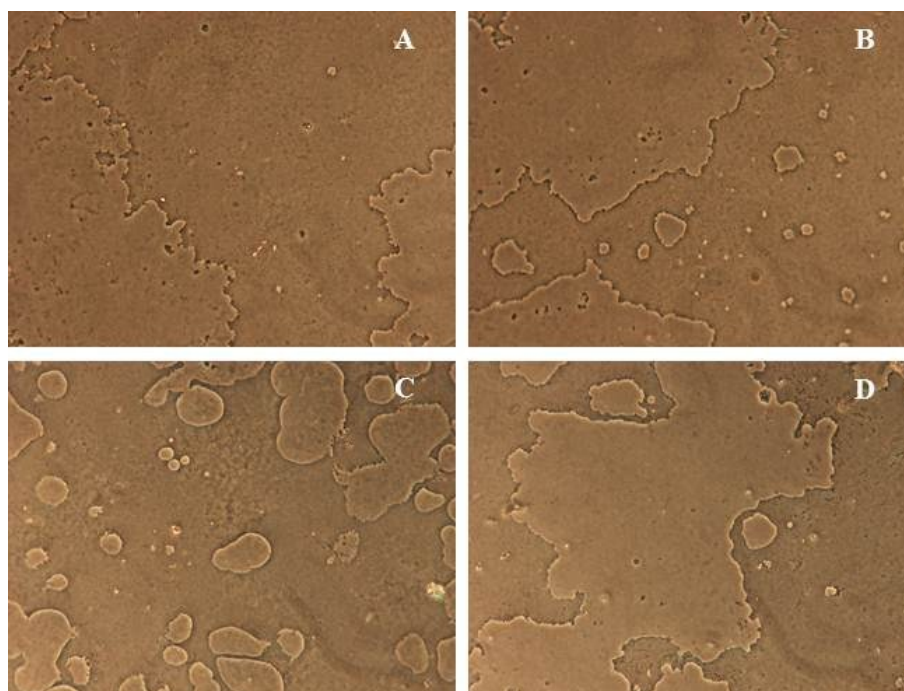
**Figura 9** – Imagens representativas da marcação imunocitoquímica das co-culturas MG63-PBMC. As células foram expostas durante 21 dias a extractos de QOE (B e E) ou de OZE (C e F), obtidos por extracção estática de amostras sujeitas a presa de 24h a 37°C, ou apenas meio de cultura completo (A e D), controlo negativo. Marcação da actina a azul, do VNR (A, B e C) e do CTR (D, E e F), a verde. Barra: 80 µm.

## Reabsorção de Fosfato de Cálcio

Avaliámos a reabsorção de fosfato de cálcio nas co-culturas MG63-PBMC expostas à diluição 1:64 dos extractos obtidos dos cimentos endodônticos, tendo observado que em todas condições experimentais se verificou reabsorção com formação das lacunas correspondentes. As figuras 10 e 11 apresentam imagens representativas da reabsorção do filme de fosfato de cálcio para cada uma das condições experimentais

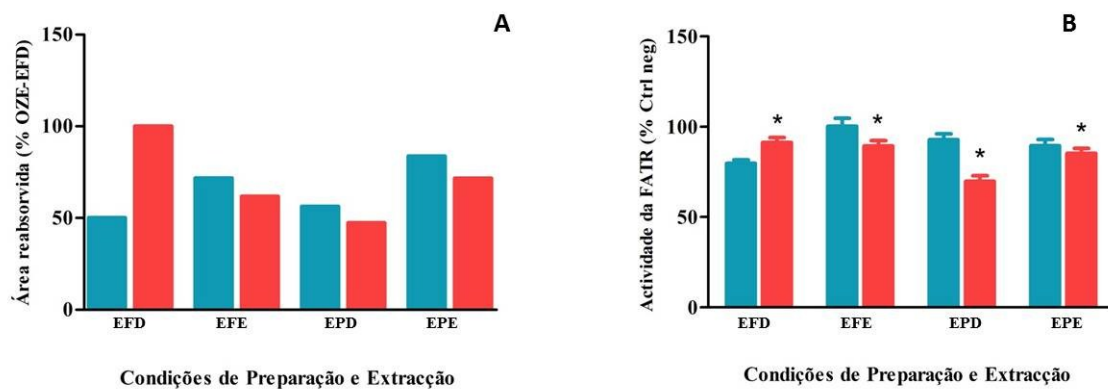


**Figura 10** – Reabsorção de fosfato de cálcio (QOE). Imagens representativas correspondentes às culturas celulares expostas a extractos obtidos de cimento de QOE sob diferentes condições de preparação e extracção: extracção dinâmica (A) e estática (B) imediatamente após a preparação do cimento, extracção dinâmica (C) e estática (D) após presa de 24h a 37°C



**Figura 11** – Reabsorção de fosfato de cálcio (OZE). Imagens representativas correspondentes às culturas celulares expostas a extractos obtidos de cimento de OZE sob diferentes condições de preparação e extracção: extracção dinâmica (A) e estática (B) imediatamente após a preparação do cimento, extracção dinâmica (C) e estática (D) após presa de 24h a 37°C

A quantificação da área reabsorvida em cada poço de cultura permitiu verificar que a exposição celular aos extractos de QOE se traduz numa reabsorção maior do que a exposição aos extractos obtidos de OZE, excepto no caso dos extractos obtidos por extracção dinâmica realizada imediatamente após a preparação do cimento, caso no qual corresponde uma maior reabsorção à exposição ao extracto de OZE (figura 12, gráfico A). Estes resultados espelham fidedignamente os obtidos na determinação da actividade da FATR após exposição das células à mesma diluição dos extractos (figura 12, gráfico B). Porém, deve-se salientar que, apesar de ambos expressos em termos percentuais, os resultados referentes à actividade enzimática são normalizados para o conteúdo proteico das culturas respectivas, enquanto os resultados da reabsorção são absolutos



**Figura 12** - Reabsorção de fosfato de cálcio (A) e actividade da FATR (B). Culturas celulares expostas durante 21 dias a uma diluição 1:64 de extractos obtidos a partir de amostras de cimento endodôntico preparado sob diferentes condições: extracção dinâmica (EFD) ou estática (EFE) imediatamente após preparação do cimento, extracção dinâmica (EPD) ou estática (EPE) após presa de 24h a 37°C. A reabsorção foi quantificada por integração das áreas lacunares, observadas em 8 imagens diferentes seleccionadas aleatoriamente de cada condição experimental. Todos os valores foram calculados como percentagens relativamente aos valores obtidos no mesmo dia para OZE-EFD (gráfico A) ou o correspondente controlo negativo (gráfico B). Legenda: QOE, barras azuis, OZE, barras vermelhas, \*,  $p < 0,0001$ , (teste de Mann-Whitney).

## Discussão

Vários estudos publicados ao longo dos anos sobre a compatibilidade biológica dos materiais de selamento endodontico revelaram que muitos apresentam propriedades citotóxicas *in vitro* e *in vivo*, tendo sido descritos efeitos de toxicidade celular directa<sup>16,17</sup> e indirecta<sup>15,18</sup>, efeitos pró-inflamatórios<sup>22</sup> e, inclusivamente, efeitos mutagénicos.<sup>26</sup> Uma vez que se trata de substâncias destinadas a permanecer em contacto directo ou indirecto com os tecidos periodontais e, em muitas ocasiões, com lesões periradiculares, importa aferir rigorosamente a sua biocompatibilidade para que seja possível garantir a segurança dos doentes e o sucesso do tratamento endodontico realizado. Os ensaios de compatibilidade *in vitro* constituem o primeiro passo nesta avaliação.

Neste trabalho, visámos avaliar um novo cimento endodontico, constituído por quitosano, óxido de zinco e eugenol (QOE), recorrendo a dois modelos experimentais *in vitro* para testar os seus efeitos sobre o componente celular do osso alveolar face aos efeitos promovidos pelo óxido de zinco-eugenol (OZE). Com este objectivo em mente, utilizámos culturas de células MG63, uma linha celular de osteossarcoma humano que expressa muitas das propriedades dos osteoblastos e é amplamente utilizada em ensaios de biocompatibilidade, bem como, co-culturas de células MG63 e PBMC, nas quais se observa a expressão de marcadores moleculares e funções características dos osteoclastos nas células PBMC diferenciadas. De facto, observámos nestas co-culturas diversas evidências de diferenciação osteoclástica, designadamente, a presença de anéis de actina, a expressão de receptores para a calcitonina e receptores para a vibronectina, bem como, actividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR) e reabsorção de um filme de fosfato de cálcio. Com o primeiro modelo, visámos investigar o efeito tóxico dos componentes extraídos dos cimentos endodonticos sobre os osteoblastos do osso alveolar, com o segundo, investigámos a influência destes componentes sobre a diferenciação e actividade osteoclástica.

Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular demonstraram claramente que ambos os cimentos apresentam potencial citotóxico, produzindo uma diminuição marcada da viabilidade celular dependente da concentração. Não obstante, os resultados para os dois períodos de exposição celular testados indicam que o QOE é

menos citotóxico que o OZE. Este efeito poderá dever-se ao menor conteúdo em óxido de zinco ou outro componente do pó no cimento de QOE relativamente ao cimento de OZE, menos 25% (p/p) do conteúdo em pó, pois, apesar de se reconhecer que a toxicidade do OZE se deve principalmente à libertação de eugenol, alguns resultados indicam que também o óxido de zinco possui potencial citotóxico.<sup>27</sup> Por outro lado, apesar da formulação do QOE testada apresentar o mesmo conteúdo em eugenol que o OZE, a libertação deste componente citotóxico para o meio de extracção pode ser reduzida pela interacção com o quitosano presente no cimento. No entanto, esta interacção hipotética não se encontra descrita na literatura, pelo que a clarificação da causa subjacente à menor toxicidade do QOE face ao OZE requer estudos adicionais.

Apesar de se ter verificado, para a generalidade das condições experimentais, uma diminuição de viabilidade celular mais marcada nas culturas expostas a extractos de OZE do que nas culturas expostas a extractos de QOE, especialmente com os extractos menos concentrados, os resultados foram mais ambíguos para os extractos obtidos de cimento preparado imediatamente antes da extracção dinâmica. É possível que estas condições propiciassem a produção de um extracto mais concentrado, devido uma maior desagregação mecânica da amostra e solubilização de componentes dos cimentos, apesar de isto não se ter constatado macroscopicamente. Assim sendo, os resultados reflectiriam o que se observou nas restantes condições experimentais para os extractos menos diluídos, ou seja, uma diferença de efeitos menos marcada ou até inexistente entre os dois cimentos.

Na realidade, quando comparámos os dois métodos de preparação das amostras de cimento, verificámos que estes não têm influência no resultado quando as amostras são extraídas de forma estática. Contudo, a exposição celular a extractos obtidos por extracção dinâmica resulta em diferenças significativas entre os cimentos sujeitos a presa e os cimentos extraídos imediatamente após a sua espatulação. No caso do QOE, a presa do cimento parece diminuir o seu potencial de toxicidade, o que seria espectável, uma vez que a maior agregação do cimento resultante da presa dificultaria a dissolução dos seus componentes. No entanto, no caso do OZE, é o cimento após a presa que parece possuir maior citotoxicidade. É possível que esta diferença de comportamento entre cimentos reflecta diferenças nas suas propriedades mecânicas, uma vez que a extracção dinâmica envolve também uma acção física sobre as amostras. No entanto, é difícil extrapolar conclusões a partir destes resultados quanto ao comportamento clínico

expectável destes cimentos. Porém, é possível que o QOE produza menor toxicidade celular à medida que toma presa, em linha com o que se observa para outros cimentos endodónticos.<sup>18, 28</sup>

A análise dos resultados referentes à actividade da FATR, um marcador funcional dos osteoclastos, revelou que ambos os cimentos induzem uma diminuição da actividade enzimática que tende a ser mais acentuada com a crescente concentração dos extractos. Todavia, quando comparados os efeitos dos dois cimentos, verificou-se uma tendência clara para uma inibição da actividade da FATR mais pronunciada após a exposição celular aos extractos de OZE do que após exposição ao QOE.

Estes resultados foram, em certa medida, confirmados na experiência de reabsorção do fosfato de cálcio, pois, este ensaio revelou um padrão de efeitos da exposição aos extractos diluídos 1:64 análogo ao observado no ensaio da actividade da FATR. Curiosamente, os resultados da exposição celular aos extractos (1:64) obtidos por extracção realizada imediatamente após a preparação das amostras (EFD), tanto para a actividade da FATR como para a reabsorção, contrariam a tendência observada para as restantes condições com os mesmos extractos.

A causa do efeito diferencial dos cimentos sobre a actividade da FATR e reabsorção poderá não se dever a uma diferença no número de osteoclastos viáveis e a expressar a enzima, uma vez que para a diluição de extractos em causa (1:64), não se registou uma diferença estatisticamente significativa no número de células com marcação citoquímica de actividade da FATR. É possível que, dadas as diferenças observadas no ensaio de viabilidade celular para as células MG63, as diferenças de efeitos dos dois cimentos sobre a reabsorção e actividade da FATR se devam a uma diferença no seu efeito sobre as células MG63, uma vez que a diferenciação osteoclástica das células PBMC é induzida de forma parácrina pelas primeiras.<sup>24</sup> No entanto, as diferenças observadas também se poderão dever a uma inibição não específica do metabolismo das células PBMC, ou dos dois tipos celulares.

Quando comparados os resultados obtidos para os dois métodos de preparação dos cimentos, verificamos que apesar de se registarem diferenças estatisticamente significativas, tanto para a extracção dinâmica como estática, a interpretação dos efeitos observados é difícil. De facto, a tendência que se observa para um dado cimento, após um determinado tempo de exposição e numa condição particular de extracção, não se reflecte nos outros tempos de exposição ou na outra condição de extracção. É possível,

que a complexidade dos efeitos observados se possa dever a uma alteração da evolução da cultura celular durante os períodos testados sob exposição aos extractos, contudo, na ausência de outros dados, as interpretações são especulativas.

## **Conclusões**

Este trabalho demonstra que o cimento de QOE, comparativamente ao OZE, tem menor efeito citotóxico sobre as células MG63 e um menor efeito inibitório sobre a diferenciação e actividade osteoclástica das células PBMC, sugerindo que será melhor tolerado pelos tecidos perirradiculares. De facto, os resultados indicam que o novo cimento endodontico de QOE apresenta um perfil de biocompatibilidade superior ao do cimento de óxido de zinco-eugenol, material comumente utilizado no tratamento endodontico, pelo que dados os resultados e o perfil de biocompatibilidade favorável do quitosano, o cimento de QOE poderá constituir, em breve, uma alternativa aos cimentos endodonticos actualmente disponíveis.

## Referências

1. Johnson WT, Gutmann JL. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Pathways of the Pulp*. 9ª edição. Mosby; 2005.
2. Lin LM, Rosenberg PA, Lin J. Do procedural errors cause endodontic treatment failure? *J Am Dent Assoc*. 2005 Fev;136(2):187-93.
3. Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):69-74.
4. Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W. Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. *Endod Dent Traumatol*. 1994 Out;10(5):233-8.
5. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering: an overview. *Mar Drugs*. 2010 Ago 2;8(8):2252-66.
6. Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs*. 2010 Set 2;8(9):2435-65.
7. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005 Out; 26(30):5983-90.
8. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jan 31;62(1):3-11.
9. Gu J, Hu W, Deng A, Zhao Q, Lu S, Gu X. Surgical repair of a 30 mm long human median nerve defect in the distal forearm by implantation of a chitosan-PGA nerve guidance conduit. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Mar 3.
10. Swanson TE, Cheng X, Friedrich C. Development of chitosan-vancomycin antimicrobial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Maio;97(2):167-76.
11. Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line. *Int Endod J*. 2009 Ago;42(8):711-8.

12. Chang MC, Lin LD, Chen YJ, Tsai YL, Cheng YA, Kuo CS, Chang HH, Tai TF, Lin HJ, Jeng JH. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2010 Mar;43(3):251-7.
13. Scotti R, Tiozzo R, Parisi C, Croce MA, Baldissara P. Biocompatibility of various root canal filling materials ex vivo. *Int Endod J.* 2008 Ago;41(8):651-7.
14. da Silva PT, Pappen FG, Souza EM, Dias JE, Bonetti Filho I, Carlos IZ, Leonardo RT. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. *Braz Dent J.* 2008;19(3):228-31.
15. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2005 Nov;38(11):834-42.
16. Queiroz CE, Soares JA, Leonardo Rde T, Carlos IZ, Dinelli W. Evaluation of cytotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. *J Appl Oral Sci.* 2005 Set;13(3):237-42.
17. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Abr;95(4):483-9.
18. Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002 Nov;28(11):784-6.
19. Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod.* 2001 Set;27(9):571-3.
20. Holland R, Sant'Anna Júnior A, Souza V, Dezan Junior E, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Nery MJ, Murata SS. Influence of apical patency and filling material on healing process of dogs' teeth with vital pulp after root canal therapy. *Braz Dent J.* 2005;16(1):9-16.
21. Costa CAS, Neto CB, Hebling J, Gonzaga HFS, Abreu-e-Lima FCB. Compatibilidade biológica do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE), variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do eugenol. *Rev. Odontol. UNESP* 1996 25(1): 135-144,

22. Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J*. 2011 Mai;44(5):440-6.
23. Mutoh N, Tani-Ishii N. A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer. *Dent Mater J*. 2011;30(2):176-82.
24. Waltimo TM, Boiesen J, Eriksen HM, Ørstavik D. Clinical performance of 3 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jul;92(1):89-92.
25. Costa-Rodrigues J, Teixeira CA, Fernandes MH. Paracrine-mediated osteoclastogenesis by the osteosarcoma MG63 cell line: is RANKL/RANK signalling really important? *Clin Exp Metastasis*. 2011 Abr 9. DOI 10.1007/s10585-011-9387-7.
26. Huang TH, Lee H, Kao CT. Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based, and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endod*. 2001 Dez;27(12):744-8.
27. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J*. 2003 Mar;36(3):147-60.
28. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Jul;15(7):767-71.