

Artigo Original de Pesquisa
Original Research Article

Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares

Evaluation of the cytotoxicity of three root canal sealers used in obturation of radicular canals system

Maria Isabel SENNE*
Neide LEMOS**
Sandra Rivera FIDEL***
Rivail Antonio Sergio FIDEL****

Endereço para correspondência:

Address for correspondence:

Rivail Antonio Sergio Fidel
Rua Doutor Otávio Kelly, 63/301 – Tijuca
CEP 20511-280 – Rio de Janeiro – RJ
E-mail: rivailfidel@globo.com

* Professora do curso de Odontologia da UNIG, Mestre em Endodontia (UERJ).

** Professora de Histologia da UERJ, Doutora em Histologia.

*** Professora adjunta de Endodontia da UERJ, Doutora em Endodontia (USP).

**** Professor titular de Endodontia da UERJ, Doutor em Endodontia (USP).

Recebido em 15/4/08. Aceito em 14/6/08.

Received on April 15, 2008. Accepted on June 14, 2008.

Palavras-chave:

citotoxicidade;
cimentos endodônticos;
canais radiculares.

Resumo

Introdução e objetivo: Avaliar *in vitro* a citotoxicidade de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Endofill) e outros dois cimentos à base de resina epóxica (Sealer 26 e AH Plus) sob a linhagem de células VERO C1008. **Material e métodos:** A citotoxicidade foi avaliada por meio de um novo reagente que vem sendo usado em imunologia para extinguir a fluorescência, denominado FluoroQuench™ AO/EB, e o uso do corante serviu para avaliar as alterações morfológicas nas células em 24, 48 e 72 horas após o contato com os cimentos. **Resultados:** houve diferença nas médias dos valores da viabilidade celular pelos testes Anova e *t* de student. Em todos os períodos os cimentos Endofill e Sealer 26, quando frescos e após o endurecimento, causaram uma

diminuição significativa na densidade e na morfologia celular. **Conclusão:** O AH Plus provou ser o menos tóxico logo após a manipulação, e uma leve reação tóxica pôde ser observada quando ele foi testado após o endurecimento.

Keywords:

cytotoxicity; endodontic sealers; root canal.

Abstract

Introduction and objective: To determine in vitro the cytotoxicity of a zinc oxide-eugenol based sealer (Endofill) and two others epoxy resin based sealers (Sealers 26 and AH Plus) under the VERO C1008 cells line. **Material and methods:** The cytotoxicity was assessed through a new reagent that has been used in immunology to extinguish fluorescence, called FluoroQuench™ AO/EB, and the dye use was made in order to evaluate the morphological cell changes at three observation periods: 24, 48 and 72 hours after the contact with the cements. **Results:** There were differences in mean cell viability values by Anova and t-student tests. In all periods Endofill and Sealer 26, both fresh and set states, caused a significant decrease in the density and cell morphology. **Conclusion:** AH Plus proved to be the less toxic soon after the manipulation, and a small toxic reaction could be seen when it has been tested after the hardening.

Introdução

A avaliação do potencial irritante de novos produtos ou ingredientes surgidos no mercado é geralmente realizada em animais, anteriormente aos testes em seres humanos. Recentemente vários métodos alternativos *in vitro* para testar o potencial tóxico de alguns materiais têm sido propostos preferencialmente aos testes *in vivo* em animais [11]. A partir de 1999, a International Organization for Standardization (ISO) renovou a regulamentação de 1991 para a realização de testes da citotoxicidade *in vitro*, mediante o documento ISO 10993-5 [10], listando três categorias para tais avaliações: testes de extração, testes de contato direto e testes de contato indireto.

Cohen *et al.* [4] compararam a citotoxicidade *in vitro* de dois cimentos endodônticos: AH26 e AH Plus. A reação biológica foi determinada sobre culturas de fibroblastos (L929) usando-se o teste de difusão em ágar e o corante vermelho neutro durante a exposição por 48 horas. Na metodologia aplicada tanto o cimento AH26 como o AH Plus exibiram grau 4, ou seja, severa reação citotóxica, ressaltando os autores que esses cimentos não satisfazem as exigências das normas ISO 10993-5 [10]. Leonardo *et al.* [15], por sua vez, avaliaram microscopicamente os achados morfológicos causados por quatro cimentos à base de hidróxido de cálcio e um à base de óxido de zinco e eugenol, nos períodos de 12, 24, 48 e 72 horas. O cimento Sealapex causou o maior número de alterações sobre

as culturas de macrófagos em todos os intervalos estudados. Os cimentos Fill Canal, Sealer 26 e CRCS mostraram o menor número de alterações; o Fill Canal inicialmente foi o mais tóxico. Tai *et al.* [19] decidiram determinar a citocompatibilidade de três diferentes cimentos endodônticos comparando a resposta com duas linhagens celulares distintas: fibroblastos da gengiva e da mucosa jugal humana e células permanentes de *hamster* (V79). A sobrevivência das células foi determinada pelo teste colorimétrico MTT, durante um e três dias. Os resultados revelaram que o cimento N2 foi citotóxico no primeiro dia, piorando o quadro no terceiro dia ao registrar menos de 10% de células viáveis. Os cimentos AH Plus e Canals foram igualmente citotóxicos, marcando aproximadamente 65% de células sobreviventes.

Material e métodos

Para esse experimento foi selecionada a linhagem de células VERO (C1008 – CRL – 1586, ATCC, Rockville, MD, EUA), de acordo com o estudo de Zhu *et al.* [20] e as recomendações da ISO 10993-5 [10]. A escolha dos cimentos foi baseada em informações colhidas na disciplina Endodontia das faculdades de Odontologia das cidades do Rio de Janeiro e de Grande Rio, onde na maioria das escolas os cimentos à base de óxido de zinco/eugenol e à base de hidróxido de cálcio são os mais utilizados. De acordo com essas composições, as marcas comerciais selecionadas foram, respectivamente, os

cimentos EndoFill (Dentsply) e Sealer 26 (Dentsply). Somou-se a estes o cimento AH Plus (Dentsply), lançado mais recentemente no mercado nacional. Os cimentos empregados foram manipulados sob condições assépticas, de acordo com as recomendações dos fabricantes e do estudo de Fidel [7].

Os corantes utilizados foram: Panótico Rápido LB (Laborclin), que é um sistema de coloração diferenciado muito usado em hematologia, e FluoroQuench™ AO (Laranja de acridine)/EB (Brometo de etídio), que é o último reagente manipulado para testes de citotoxicidade, para corar células vivas (AO) e mortas (EB), extinguir a fluorescência de fundo e preservar as células [17].

Testes com os cimentos frescos e após o endurecimento - Panótico

Neste estudo foram realizadas quatro amostras para cada cimento testado, adaptando-se a metodologia de Beltes *et al.* (2) e as recomendações da ISO n.º 7405 [9] e n.º 10993-5 [10].

Para cada cimento e período de observação, prepararam-se quatro amostras e seus respectivos grupos controle. No experimento com cimentos endurecidos estes ficaram armazenados por uma noite, cerca de 12 horas, em luz ultravioleta, a fim de prevenir qualquer contaminação antes de entrarem em contato com a suspensão celular. Todas as placas ficaram incubadas a 37°C, e as observações foram concluídas em 24, 48 e 72 horas.

Testes com os cimentos frescos e após o endurecimento - FluoroQuench™

Foram realizadas 16 amostras para cada cimento testado, adaptando-se a metodologia utilizada nos testes para doação de medula do Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Uma placa de Terasaki foi separada para cada cimento, totalizando três placas. Cada uma delas foi nomeada de acordo com o material a ser testado, e elas foram divididas da seguinte forma: na parte superior oito poços foram preenchidos com cimentos que aguardavam o endurecimento; no meio da placa oito poços ficaram reservados para servir de grupo controle; e na parte inferior oito poços foram preenchidos no momento do uso com os cimentos frescos.

Passado o período de 12 horas, nova manipulação dos cimentos foi realizada para pincelá-los na parte inferior da placa. Logo em seguida, 2 µl de suspensão

celular a uma concentração de $3,5 \times 10^5$ foram dispensados sobre os cimentos. Decorrido o tempo de 1 hora, dispensaram-se 5 µl do corante FluoroQuench™ em cada poço. A observação foi realizada pela extensão relativa correspondente às áreas de coloração verde fluorescente, representativa de células viáveis, em cada amostra exposta aos cimentos. A aferição foi procedida pelo *software* Image Pro Plus (Media Cybernetic) e submetida ao teste paramétrico *t* de *student*.

Resultados

Achados morfológicos das células coradas pelo Panótico Rápido LB

O aspecto morfológico das células do grupo controle não foi alterado nos intervalos testados. Entretanto houve um aumento gradual do número de células ao longo dos períodos, em que o aspecto pôde ser visto, ocasionalmente, em algumas áreas com formação de mais de uma camada celular. As células apresentavam-se aderidas e confluentes, com aparência fusiforme e prolongamentos citoplasmáticos uniformes (figura 1).

O aspecto morfológico das células nos cimentos Endofill e Sealer 26 não diferiu nos intervalos testados. No caso dos cimentos frescos, ao redor do cimento Endofill escassas células estavam presentes. Na periferia das placas alguns grupos celulares podiam ser vistos, porém os prolongamentos citoplasmáticos estavam muito delgados com escasso citoplasma perinuclear. Nas amostras em contato com o cimento Sealer 26 houve uma grande quantidade de debris em conjunto com células aderidas, contudo estas revelaram um aspecto granuloso e prolongamentos citoplasmáticos delgados. Na periferia a maioria das células perdeu a adesão, sendo perdidas durante a remoção do meio e no processo de coloração. Nos testes com os cimentos endurecidos, tanto para o Endofill como para o Sealer 26 as células não alcançaram confluência nem adesividade à placa, reduzindo gradativamente entre o período de 24 e 72 horas (figuras 2 e 3).

Para as amostras do cimento AH Plus, quando frescas as células perderam seus prolongamentos citoplasmáticos e ficaram com aspecto arredondado em número reduzido, porém muitas estavam presentes e ainda mantinham o aspecto circular. Quando endurecidas, o aspecto celular assemelhava-se com o grupo controle, revelando células estreladas com prolongamentos citoplasmáticos uniformes, e o cimento não interferiu na confluência e na adesão ao fundo da placa (figura 4).

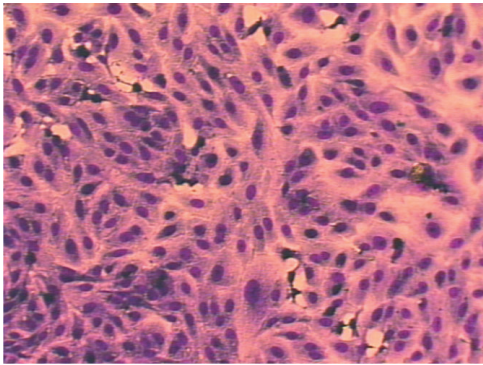


Figura 1 - Controle 24 horas (20x)

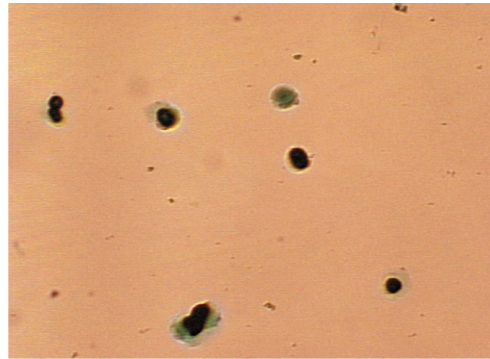


Figura 2 - Cimento Endofill 72 horas - endurecido (20x)

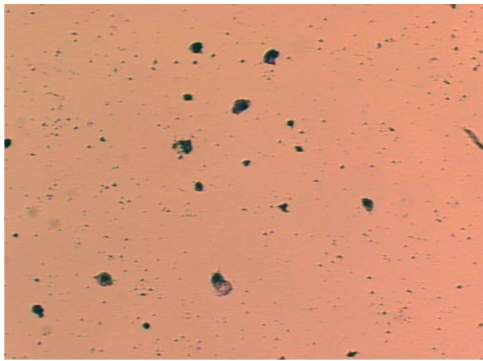


Figura 3 - Cimento Sealer 26 72 horas - fresco (20x)

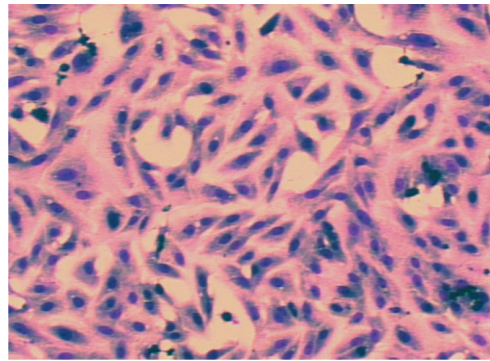


Figura 4 - Cimento AH Plus 72 horas - endurecido (20x)

Amostra das células coradas com FluoroQuench™

As figuras 5 a 8 representam o resultado de uma das amostras do grupo controle e dos cimentos Endofill e AH Plus. As células com a coloração verde fluorescente são representativas das células viáveis, e as vermelhas são células ainda vivas, porém não viáveis. Nas amostras expostas aos cimentos Endofill e Sealer 26 não foi possível visualizar expressiva fluorescência, o que mostrou um alto grau de citotoxicidade para essa metodologia.

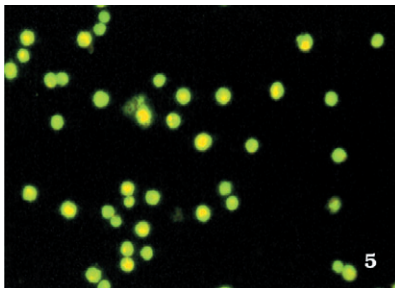


Figura 5 - Controle (20x)

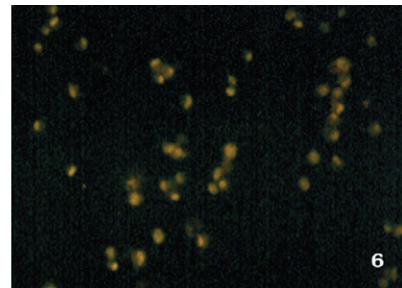


Figura 6 - Cimento Endofill endurecido (20x)



Figura 7 - Cimento Sealer 26 endurecido (20x)

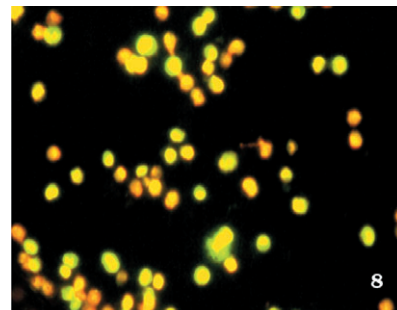


Figura 8 - Cimento AH Plus endurecido (20x)

Discussão e conclusões

A obturação hermética do sistema de canais radiculares por meio de materiais biologicamente compatíveis continua sendo uma das metas das pesquisas em Endodontia. Com as técnicas mais modernas de instrumentação e obturação, em algumas situações torna-se difícil evitar um discreto extravasamento do material obturador. Nesse caso, foi despertada a necessidade de estudos mais aprofundados quanto ao comportamento biológico, sem desfavorecer as propriedades físicas e químicas, tentando-se encontrar algum cimento obturador que venha satisfazer tanto aos anseios dos profissionais que trabalham diariamente em clínica como aos pesquisadores da área afim.

Após Grossman [8] introduzir na Endodontia um cimento à base de óxido de zinco e eugenol, diversos pesquisadores têm procurado testar outros cimentos alternativos na busca de encontrar algum que apresente melhor tolerância tecidual e que consiga, ao mesmo tempo, reunir boas propriedades físicas. De uso crescente em Endodontia, os cimentos à base de resina epóxica foram largamente difundidos nos Estados Unidos com o nome comercial AH26, cuja formulação original de 1959 foi alterada, suprimindo o pó de prata e o óxido de titânio [13]. No Brasil uma versão similar do AH26 é comercializada com o nome Sealer 26, o qual apresenta hidróxido de cálcio em sua formulação. Mais recentemente a Dentsply lançou no mercado o AH Plus, desenvolvido para oferecer melhores características técnicas, clínicas e citotóxicas que o original AH26. Apesar dos bons resultados encontrados por Leonardo *et al.* [14] para o cimento AH Plus quando comparado ao AH26, Cohen *et al.* [4] e Schweikl e Schmalz [18] alertam para a possibilidade dos efeitos mutagênicos após os achados *in vitro*, o que não foi encontrado nos testes para mutagenicidade de Leyhausen *et al.* [16].

Não obstante os dados já descritos, é necessário considerar que o AH Plus é um produto recente. O desenvolvimento de novas pesquisas poderá, no futuro, não só consolidar melhor esses efeitos, como também oferecer aos clínicos outras opções de escolha.

O uso de corantes fluorescentes vem sendo aprimorado como uma boa alternativa aos testes que utilizam o ^{51}Cr . Apesar de ser bem aceito pela sua simplicidade e confiabilidade, os componentes radioativos oferecem riscos ao usuário em virtude do seu manuseio, estocagem e descarte. Além disso, seu emprego envolve procedimentos laboriosos, o que soma mais uma desvantagem a essa metodologia.

Muitos materiais, particularmente os obturadores do sistema de canais radiculares, permanecem em contato com tecidos vitais por longo período, quando ocorre agressão celular por elementos químicos, físicos e mecânicos, sendo a respiração um dos primeiros sistemas celulares afetados. Alguns agentes agressores, especialmente os químicos, bloqueiam sistemas enzimáticos importantes na síntese proteica e/ou na geração de ATP; outros levam à geração de produtos intracelulares nocivos ou, ainda, atuam diretamente destruindo componentes estruturais vitais da célula.

Em função desses fenômenos, complementamos às metodologias utilizadas a visualização microscópica das alterações morfológicas das células usando o corante Panótico, que é nacional e semelhante ao Giemsa, o qual serve para células sanguíneas e já foi experimentado para tal finalidade [2]. Na literatura especializada, as pesquisas em torno da citotoxicidade de materiais de uso odontológico têm sido feitas explorando o emprego de cultura de células. Entretanto a comparação dos resultados é um processo difícil e por vezes até impossível, pois existem muitas variações nas condições experimentais quanto ao tipo de célula escolhido, ao método de contato célula/material e ao tempo de exposição.

No presente estudo, realizamos um modelo *in vitro* em cultura de células anaploides (fibroblasto V1008), colocadas em contato direto com três diferentes formulações de cimentos endodônticos logo após a sua manipulação e o seu endurecimento no uso de dois diferentes corantes. Todos os cimentos testados foram citotóxicos em algum momento, mostrando diferentes níveis na proliferação e na morfologia celular. O cimento Endofill, à base de óxido de zinco e eugenol, foi altamente citotóxico tanto fresco quanto depois do endurecimento, para ambas as metodologias empregadas. Esse efeito citotóxico foi também encontrado por Chang *et al.* [3], que testaram cimentos com formulações semelhantes para o mesmo intervalo de tempo ou em diferentes períodos [1].

De comportamento bem semelhante, porém mostrando no intervalo de 24 horas ter sido significativamente melhor que o Endofill quando endurecido, o cimento Sealer 26 é à base de resina epóxica, que contém hidróxido de cálcio na sua formulação. Por ser comercializado no Brasil e em alguns países da América do Sul, poucos estudos citados acerca da sua citotoxicidade foram encontrados, o que veio evidenciar o limitado valor das publicações nacionais. Mesmo assim, pôde-se estabelecer uma comparação com os trabalhos de Daniel *et al.* [6], que acharam resultados parecidos, com inibição do crescimento celular em 24 horas para o cimento Sealer 26, usando a mesma metodologia deste estudo.

Diferentemente, resultados favoráveis ao emprego desse cimento foram demonstrados no estudo de

Leonardo *et al.* [14], por meio dos achados morfológicos em macrófagos peritoniais de ratos. Resultados semelhantes, mostrando o bom comportamento do AH Plus, estão evidenciados nos estudos de Leyhausen *et al.* [16], Azar *et al.* [1] e Schweikl e Schmalz [18]. É interessante ressaltar que foram os achados de Cohen *et al.* (4) e Leonardo *et al.* (12) que demonstraram baixos níveis de liberação de uma substância conhecidamente tóxica, o formaldeído (FA), após a manipulação do cimento AH Plus, fato esse não revelado pelo fabricante. Entretanto, segundo Schweikl e Schmalz [18], a citotoxicidade do AH Plus está ligada à presença da resina epóxica na pasta A da sua apresentação.

A avaliação da citotoxicidade é importante, pois permite esclarecer o mecanismo biológico pelo qual o efeito citotóxico é produzido e o mecanismo de ação de diferentes materiais durante a interação material/tecido. Contudo reconhecemos que o teste apresenta limitações.

O uso de cultura de células em monocamadas não é fisiológico, não reproduzindo a arquitetura tecidual *in vivo*, na qual as células subjacentes poderiam realizar o reparo da agressão superficial. A presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material seja tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência do efeito citotóxico é a garantia de uma boa resposta clínica.

Referências

1. Azar NG, Heidari, M, Bahrani ZS, Shokry F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000 Aug;26(8):462-5.
2. Beltes P, Koulaouzidou E, Kolokuris I, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two glass-ionomer root canal sealers. *J Endod.* 1997 Sep;23(9):572-4.
3. Chang YC, Tai KW, Huang FM, Huang MF. Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. *J Endod.* 2000 Aug;26(8):440-3.
4. Cohen B, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod.* 2000 Apr;26(4):228-29.
5. Cohen S, Burns R. Caminhos da polpa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 196-200.
6. Daniel RLDP, Jaegger MMM, Bombana AC. Análise comparativa da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos sobre cultura de fibroblastos NIH 3T3. *Rev. Pós-Grad. USP.* 1998;out/nov/dez;5(4):61.
7. Fidel RAS. Estudo das propriedades físico-químicas de alguns cimentos obturadores dos canais radiculares contendo hidróxido de cálcio. [Tese – Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto; 1993.
8. Grossman LI. Tratamento dos canais radiculares. Rio de Janeiro: Atheneu; 1956.
9. International Organization for Standardization – ISO 7405: dentistry-preclinical evaluation of biocompatibility of devices used in dentistry-test methods for dental materials. Geneve; 1997.
10. International Organization for Standardization – ISO 10993: Part 5. Biological testing of medical and dental materials and devices-tests for cytotoxicity in vitro methods. Geneve; 1999.
11. Lee JK, Kim DB, Kim JI, Kim PY. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol Vitro.* 2000 Aug;14(4):345-9.
12. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Aug;88(2):221-5.
13. Leonardo MR, Leal JM. Endodontia: tratamento de canais radiculares. 3. ed. São Paulo: Panamericana; 1998.
14. Leonardo MR, Da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.* 1999 Feb;15(1):28-32.
15. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod.* 2000 June;26(6):328-30.
16. Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH Plus. *J Endod.* 1999 Feb;25(2):109-13.
17. Roden MM, Lee K, Panelli, MC, Marincola FM. A novel cytotoxicity assay using fluorescent scanning technology. *J Immunol Methods.* 1999 Jan;226(1-2):29-41.
18. Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. *Biomaterials.* 2000 May;21(9):939-44.
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 Sep;27(9):571-3.
20. Zhu Q, Safavi Ke, Spangberg LS. Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells. *J Endod.* 1999 June;25(6):410-2.