

Cláudia Sofia da Cunha Mesquita Rodrigues Vieira dos Santos

**Estudo *in vitro* da biocompatibilidade dos  
cimentos de obturação endodônticos**



Porto, 2012



# **Estudo *in vitro* da biocompatibilidade dos cimentos de obturação endodônticos**

Orientador:

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas

Co-orientadora:

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes



Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina Dentária,  
submetida à Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto.



## **Conselho Científico da Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto**

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor António Cabral Campos Felino (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha (Prof. Associado)

Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz (Prof. Associado)

Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor José Carlos Reis Campos (Prof. Auxiliar c/ agregação)

Prof. Doutor José Mário Castro Rocha (Prof. Auxiliar)

Prof. Douto Manuel José Fontes de Carvalho (Prof. Associado)

Prof. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann (Prof. Associado)

Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva (Prof. Associada c/agregação)

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz (Prof. Associado - personalidade convidada)

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo (Prof. Associado c/ agregação)

Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida (Prof. Associado c/ agregação)



## **Docentes Jubilados**

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira (**Prof. Catedrático**)

Prof. Doutor Amilcar Almeida Oliveira (**Prof. Associado**)

Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas (**Prof. Associado †**)

Dr. António Ulisses Matos dos Santos (**Assistente Convidado**)

Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira (**Prof. Associado c/Agregação**)

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas (**Prof. Catedrático**)

Dr. José Maria Vaz Osório (**Assistente Convidado**)

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves (**Prof. Catedrático**)

Prof. Doutor Manuel Desport Marques (**Prof. Associado Convidado †**)

Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo (**Prof. Associado**)

## ***Docentes Aposentados***

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas (**Prof. Auxiliar**)

Prof. Dr. Artur Manuel Osório de Araújo (**Prof. Associado Convidado**)

Prof. Doutor Fernando Jorge Morais Branco (**Prof. Catedrático**)

Prof. Doutor Fernando José Brandão Martins Peres (**Prof. Catedrático †**)

Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo (**Prof. Associado c/ agregação**)

Prof. Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo (**Prof. Catedrático**)

Prof. Doutor Manuel Pedro da Fonseca Paulo (**Prof. Catedrático**)

Prof. Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas (**Prof. Associada †**)

Prof. Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares (**Prof. Catedrática**)

Prof. Doutor Rogério Serapião Martins Aguiar Branco (**Prof. Catedrático**)

**Ao meu marido,**

**José Carlos**

**Aos meus tesourinhos,**

**Matilde e João (e bebé)**



**Aos meus super pais**

**Ao meu irmão**



# Índice





Agradecimentos.....	XIX
Resumo.....	XXV
Abstract.....	XXXI
Enquadramento.....	XXXVII
Introdução.....	43
Capítulo I	
Osteoblastic cytocompatibility of endodontic sealers extracts prepared according to ISO standards and a root-dipping technique .....	81
Capítulo II	
Long-term dose and time-dependent cytotoxicity profile of endodontic sealers in human <i>in vitro</i> osteoclastogenesis.....	97
Capítulo III	
Behaviour of co-cultured human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers.....	121
Discussão.....	143
Conclusões.....	157



# Agradecimentos



Durante o tempo de realização deste trabalho, comecei a apelidar esta tese de meu “fantasma”, porque mesmo nos períodos em que me dediquei menos à sua elaboração, a sua sombra estava sempre presente, e como tal acompanhou a minha vida pessoal e profissional. O “fantasma” viu a minha filha crescer, deixar de ser bebé e tornar-se uma menina, aprender as letras e os números e perceber que a mamã tinha um trabalho importante para fazer; viu o meu filho nascer, dar os primeiros passos e dizer as primeiras palavras; viu os meus pacientes entrar e sair do consultório; viu os meus alunos crescerem na arte da endodontia; viu as mudanças na faculdade e no departamento...enfim, fez parte da minha vida. E como tal, para além do conteúdo científico, esta tese tem um grande conteúdo emocional. E só foi possível a sua elaboração, porque muitas pessoas contribuíram com a sua sabedoria e, sobretudo, com a sua amizade.

Ao Professor Doutor José António Macedo de Carvalho Capelas, meu orientador, agradeço ter continuado a orientação desta tese aquando da aposentação do Prof. Doutor Manuel Paulo; obrigada pelos ensinamentos ao longo destes anos, obrigada pelo exemplo e pelo estímulo na prática da Endodontia e sobretudo, obrigada pelo carinho e amizade com que sempre me tratou.

À Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes, co-orientadora deste trabalho, um agradecimento muito especial, por partilhar os seus conhecimentos, por dispor de tempo e sobretudo de paciência para orientar uma médica dentista, pouco habituada ao meio da investigação. Muito obrigada pelo exemplo de dinamismo e trabalho, e por ter disponibilizado os meios técnicos e humanos do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, tornando possível a execução de todo o trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Manuel da Fonseca Paulo, professor aposentado da FMDUP e que foi o primeiro orientador desta tese de doutoramento, um muito, muito obrigada, porque me abriu as portas para a endodontia e para a docência, e porque me continua a acompanhar com enorme amizade e carinho.

À Professora Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz e ao Professor Doutor Manuel José Fontes de Carvalho, que me acolheram e acompanharam de perto a minha evolução e o meu trabalho, agradeço a amizade, a disponibilidade e o exemplo de dedicação ao ensino e à endodontia. Muito têm contribuído para o crescimento e afirmação do

Departamento de Endodontia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, dentro e fora da instituição.

Ao Professor Doutor João Miguel da Costa Rodrigues, do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, um agradecimento sincero pelo tempo que dispensou para realizar comigo toda a parte laboratorial desta tese, pela disponibilidade, pelo dinamismo e pela simpatia que sempre mostrou. E por toda a paciência...

À Professora Doutora Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira, agradeço com muito carinho, porque me ajudou na fase inicial do trabalho e se disponibilizou em todos os momentos, mas agradeço principalmente a amizade e os incentivos constantes.

A todos os meus colegas do Departamento, em especial à Dra. Joana Barros, ao Dr. Miguel Martins, à Dra. Rita Noites e à Dra. Eva Salgueirinho, agradeço todo o apoio e todo o carinho. É um privilégio trabalhar num ambiente tão “familiar”.

À Mestre Ana Cláudia Morais de Moura Teles, minha colega, minha amiga e minha comadre. Obrigada por estar sempre presente, obrigada por todas as palavras de incentivo. Temos caminhado sempre lado a lado e tenho a convicção de que iremos continuar assim...

Ao meu marido, José Carlos, obrigada pelo seu amor e apoio ao longo de todos estes anos, por crescer comigo e permitir a realização de tantos sonhos, sempre com os pés bem assentes na terra. Juntos, já temos uma Vida.

Aos meus filhos, obrigada por serem meus. Espero que quando mais tarde lerem estas palavras, me perdoem por algumas ausências e de alguma forma isso seja compensado pelo exemplo que lhes possa estar a dar. São os sorrisos, as gargalhadas, os beijos e abraços ao final do dia que dão significado a cada segundo da minha vida.

Ao meu irmão, obrigado por fazer parte da nossa vida. Porque não é preciso estar presente em todos os momentos nem falar a toda a hora para ser indispensável...

Por fim, e porque é o agradecimento mais difícil, obrigada, muito, muito obrigada aos meus pais. É difícil agradecer porque não há palavras que traduzam a minha gratidão. Na minha tese de Mestrado escrevi nos agradecimentos: “Devo-lhes a vida, a educação, a instrução, a orientação, o exemplo... Enfim, tudo! Que este trabalho seja uma forma de

demonstrar que mereci tudo o que me deram.” Agora, subscrevo e acrescento: obrigada por serem o prolongamento dos meus braços, das minhas pernas e sobretudo do meu coração. Obrigado pela dedicação incondicional a mim e aos meus filhos, obrigada por serem os melhores pais e avós do mundo, obrigada por nunca estarem cansados, nunca estarem tristes, nunca estarem indisponíveis...Esta tese é o resultado do meu trabalho, apoiada por todas as pessoas a quem já agradei e outras aqui não referidas, mas só foi possível porque os meus pais estiveram sempre ao meu lado. Por isso, esta tese é deles...





# Resumo



A biocompatibilidade é uma característica importante dos materiais utilizados em medicina dentária, uma vez que alguns dos seus constituintes podem ser tóxicos para os tecidos vivos. No caso dos cimentos de obturação endodônticos, esta é uma propriedade essencial, já que podem contactar diretamente com diversos tipos de células, nomeadamente células ósseas, principalmente se há extrusão de material para os tecidos periapicais. Estão disponíveis comercialmente inúmeros cimentos de obturação, com diferentes formulações. Ao longo dos anos, a sua biocompatibilidade tem sido estudada *in vitro* e *in vivo*. No entanto, surgiram recentemente novos cimentos de obturação e tornaram-se possíveis novas abordagens para os estudos *in vitro*, razões pelas quais optamos pela realização deste trabalho.

A remodelação óssea é um processo contínuo que envolve a ação conjunta dos osteoblastos e dos osteoclastos. Os osteoblastos são as células responsáveis pela produção da matriz extracelular e têm um papel importante na regulação da diferenciação e ativação dos osteoclastos. Estes, por sua vez, são as células especializadas na reabsorção óssea, quer durante a remodelação óssea fisiológica, quer nas situações patológicas em que a reabsorção está aumentada. A remodelação óssea é, portanto, um processo complexo que exige a ação coordenada destes dois tipos celulares. Por isso, a avaliação *in vitro* de materiais que têm contacto direto com o osso, como é o caso dos cimentos de obturação endodônticos, deve basear-se não apenas na proliferação e diferenciação dos osteoblastos, mas também na diferenciação e ativação dos osteoclastos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* de cinco cimentos de obturação, com diferentes composições (GuttaFlow®, AH Plus®, Sealapex®, Tubliseal® and RealSeal®), no comportamento de células osteoblásticas, células osteoclásticas e co-culturas de células osteoclásticas e osteoblásticas.

No 1º trabalho, os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e, imediatamente a seguir, preparam-se extratos em meio de cultura utilizando dois tipos de metodologia – a Norma ISO 10993-5 (2 cm<sup>2</sup> de área do cimento/1,5 ml de meio; 24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/ar) e a técnica de imersão dos ápices radiculares (um ápice radicular/1,5 ml de meio; 24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/ar). As células osteoblásticas MG63 foram cultivadas na presença de uma gama de concentrações dos dois tipos de extratos (extrato puro; diluições de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20) durante 1 e 3 dias (teste de toxicidade aguda). Numa

outra experiência, as células MG63 foram cultivadas durante 21 dias (efeito a longo prazo) na presença da concentração mais baixa dos dois tipos de extratos (1:20). Ambos os extratos causaram efeitos tóxicos agudos e a longo prazo na proliferação/viabilidade celular. Os resultados mostraram efeitos dependentes da dose e do tempo de exposição, e diferenças significativas entre os materiais. O GuttaFlow apresentou baixa toxicidade, significativamente menor que os restantes cimentos. AH Plus, Sealapex, Tubliseal e RealSeal inibiram o crescimento celular e a toxicidade aumentou com a concentração e o tempo de exposição. Os extratos preparados de acordo com a norma ISO causaram efeitos tóxicos mais significativos. No entanto, os dois tipos de extratos, preparados por metodologias diferentes, providenciam informação relevante sobre a toxicidade dos cimentos endodônticos.

O 2º trabalho avaliou o comportamento de células osteoclásticas humanas (obtidas a partir de precursores presentes no sangue periférico) na presença de uma gama de concentrações dos extratos dos cimentos endodônticos preparados de acordo com a Norma ISO 10993-5 (1.3 cm<sup>2</sup>/ml; 24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/ar; diluições de 1:20, 1:100, 1:500 e 1:2500). As células foram expostas durante 21 dias. Os extratos causaram efeitos inibitórios, que se refletiram por uma diminuição da atividade da TRAP, presença de anéis de actina e de recetores para a calcitonina e vitronectina, atividade de reabsorção e expressão de genes osteoclastogénicos. Os vários cimentos diferiram no perfil de resposta e nas vias de sinalização intracelulares. O GuttaFlow apresentou menor toxicidade que os outros cimentos. De referir, que se observou uma adaptação progressiva das células aos efeitos inibitórios dos cimentos.

O 3º estudo avaliou o efeito de extratos dos cimentos endodônticos em co-culturas de osteoclastos e osteoblastos humanos, obtidos a partir de precursores presentes no sangue periférico e na medula óssea, respetivamente. As condições experimentais foram semelhantes às descritas no segundo estudo. Os extratos causaram efeitos inibitórios em parâmetros osteoblásticos e osteoclásticos. A inibição foi mais significativa durante as duas primeiras semanas. Os cimentos diferiram no perfil de resposta, e o GuttaFlow revelou menor toxicidade. A resposta osteoblástica foi mais sensível aos efeitos tóxicos dos extratos que a resposta osteoclástica, e apresentou menor capacidade de adaptação ao longo do tempo.

Apesar de os cimentos de obturação causarem reações de citotoxicidade em modelos de culturas celulares, isto não reflete necessariamente risco de reações adversa em ambiente clínico. Os tecidos orais são geralmente mais resistentes a substâncias tóxicas que as culturas celulares, devido à sua estrutura tridimensional, a presença de matriz extracelular e a contínua circulação de fluidos. Além disso, a atividade anti-inflamatória e o suprimento sanguíneo dos tecidos podem minimizar a toxicidade inicial destes materiais. Contudo, os resultados deste estudo *in vitro* sugerem que, durante a fase de obturação dos canais radiculares, deve proceder-se de forma a evitar a extrusão de material para a zona periapical, de modo a prevenir efeitos indesejados. São necessários estudos clínicos prolongados e controlados para melhor compreender as implicações destes resultados *in vitro*.



# Abstract





Biocompatibility is an important requirement for a dental material, because some of their components might be toxic to the living tissues. In the case of root canal sealers, good tissue compatibility is an essential quality, once they can become in direct contact with several cell types, namely bone cells, especially if extruded to the periapical tissues. There is a variety of commercially available root canal sealers, based in different formulae. Over the years, their biocompatibility has been studied *in vitro* and *in vivo*. However, recently, new root canal sealers were introduced and new *in vitro* approaches became available. This is the reason to perform this work.

Bone remodeling is a continuous process, involving a coordinated action of osteoblasts and osteoclasts. Osteoblasts are responsible for the formation of the bone extracellular matrix and have also a role in the regulation of the differentiation and activity of osteoclasts. Osteoclasts are cells specialized in bone resorption during normal bone remodeling and in pathologic states in which bone resorption is increased. Bone remodeling is a complex process that requires the coordinated action of these two cell types. For this reason, the *in vitro* evaluations of materials that contact with bone, as endodontic sealers, should involve not only the analysis of osteoblast proliferation and differentiation but also the differentiation and activity of osteoclasts.

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of five endodontic sealers, based on different formulae (GuttaFlow™, AH Plus™, Sealapex™, Tubliseal™ and RealSeal™), on the behaviour of osteoblastic cells, osteoclastic cells and co-cultures of osteoclastic and osteoblastic cells.

In the first study, the endodontic cements were prepared following the manufacturer's instructions and, immediately after, they were extracted with culture medium (24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/air) according to ISO Standards 10993-5 (2 cm<sup>2</sup>/1.5 ml) or the root-dipping technique (filled root tooth/1.5 ml). MG63 cells were exposed to a concentration range of the two extracts (pure extract and 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20 dilutions) for 1 and 3 days (acute toxicity). Also, MG63 cells were cultured for 21 days (long-term toxicity) in the presence of the lowest concentration of each extract (1:20). Both types of extracts caused acute and long-term toxicity in the cell viability/proliferation. Results showed dose- and time-dependent effects and significant differences among the materials. GuttaFlow exhibited the lowest toxicity, compared to the other tested cements. Toxicity of AH Plus, Sealapex, Tubliseal and RealSeal increased with the extract concentration and the exposure time. The extracts prepared according to the ISO standard caused significantly higher effects,

compared to those prepared by the root dipping technique. However, both types of extracts provided relevant information regarding the cytotoxicity of the endodontic sealers.

The second study addressed the behavior of human osteoclastic cells (from mononuclear precursors present in the peripheral blood) in the presence of a concentration range of the cements' extracts, prepared according to ISO Standards 10993-5 (1.3 cm<sup>2</sup>/ml; 24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/air; dilutions of 1:20, 1:100, 1:500 and 1:2500), Cells were exposed during 21 days. The extracts caused inhibitory effects, reflected by a decrease in TRAP activity, presence of actin rings and receptors for calcitonin and vitronectin, resorption activity and expression of osteoclastogenic genes. The tested cements presented differences in the cell response profile and in the intracellular signaling pathways. GuttaFlow presented the lowest cytotoxicity. Results also showed a progressive adaptation of the cell response to the inhibitory effects of the extracts.

The third study evaluated the effects of the cements' extracts in co-cultures of human osteoclasts and osteoblasts, obtained from precursors present in the peripheral blood and bone marrow, respectively. The experimental conditions were similar to those used in the second study. The extracts caused inhibitory effects in osteoblastic and osteoclastic parameters. The inhibition was more significant during the two first weeks. The cements differed in the elicited cell response, and GuttaFlow revealed the lowest toxicity. In the co-culture system, the osteoblastic response was more sensitive to the extracts' cytotoxicity, and presented a lower ability of adaptation during a long exposure, compared to the osteoclastic cells.

Although endodontic sealers elicit cytotoxic responses in cell culture models, this does not necessarily reflect long-term risk for adverse effects in the clinical setting. Oral tissues are generally more resistant to toxic substances than cultured cells, due to the tridimensional structure, the presence of an extracellular matrix and the continuous fluid flow. In addition, the inflammatory activity together with intact blood supply in tissue repair process could minimize the initial toxicity of these materials. However, the *in vitro* results of this study suggest that caution is needed in root canal obturation, to prevent that material is extruded in periapical tissues, in order to avoid apex reactions.

Long-term, controlled clinical studies are needed to better understand the clinical implications of these *in vitro* effects.



# ENQUADRAMENTO



A Endodontia tem assumido, nos últimos anos, uma importância crescente no panorama da medicina dentária, na perspectiva do profissional, do paciente e dos fabricantes de material dentário.

Para nós, médicos dentistas, a endodontia tem vindo a ocupar uma percentagem cada vez maior do tempo de trabalho, porque estamos empenhados em manter a dentição do paciente e porque dispomos de técnicas, materiais e aparelhos cada vez mais eficientes e diversificados, permitindo maior sucesso no tratamento endodôntico. Exemplos disso são os localizadores eletrónicos do ápice, os instrumentos rotatórios de níquel-titânio, vários sistemas de irrigação e técnicas de obturação de maior facilidade de execução e de maior previsibilidade, novas fórmulas de cimentos e a utilização do microscópio e de aparelhos laser.

Os pacientes de hoje, mais exigentes consigo e com os profissionais, esperam manter os seus dentes naturais em função por mais tempo, e estão dispostos a investir mais tempo e dinheiro em tratamentos que preservem a função mastigatória e a estética facial.

A indústria e comércio de material dentário têm investido muito em inovações na área da endodontia, e temos assistido na última década a consideráveis melhorias nos materiais e equipamentos direcionados para estes tratamentos. Este interesse crescente é uma resposta às necessidades do mercado e, também, uma das causas do maior investimento dos clínicos nesta área de tratamento, porque têm a possibilidade de obter melhores resultados com menores dificuldades e riscos.

As taxas de sucesso do tratamento endodôntico têm vindo a subir ao longo dos anos, mas ainda existem casos de insucesso no tratamento e retratamento dos canais radiculares. Há vários estudos de controlo dos tratamentos endodônticos, por exemplo, Grossman et al<sup>1</sup> (1964), Sjögren et al<sup>2</sup> (1990), Eriksen<sup>3</sup> (1991), Friedman<sup>4</sup> (1998), Imura et al<sup>5</sup> (2007). A maior parte dos estudos avalia os resultados dos tratamentos endodônticos realizados por especialistas<sup>5</sup> ou em clínicas universitárias<sup>6,7</sup>, sendo as taxas de sucesso normalmente superiores (mais de 90%) às que se observam em estudos com os clínicos generalistas<sup>8,9</sup> (65-75%). É muito difícil comparar as taxas de sucesso/insucesso, uma vez que os estudos utilizam amostras e metodologias muito diversas, no entanto, uma revisão extensiva da literatura, de Torabinejad et al<sup>10</sup>, em 2007, mostrou que as taxas de sucesso variam de 80 a 98%, e uma revisão similar de

Eleman RF<sup>11</sup>, em 2010, refere taxas de sucesso de 86%. Julgamos fundamental perceber as causas dos insucessos.

O tratamento endodôntico radical é um procedimento com várias fases, desde o diagnóstico até à restauração do dente, e o insucesso pode dever-se à técnica e/ou aos materiais utilizados em qualquer uma dessas fases. O rigor das técnicas e a utilização de materiais biocompatíveis podem, portanto, aumentar a taxa de sucesso.

Após a preparação biomecânica dos canais radiculares, procede-se à sua obturação, quase sempre utilizando um material central sólido (guta-percha ou resilon) associado a um cimento de obturação. Os cimentos de obturação dos canais radiculares devem possuir uma série de propriedades físicas e químicas que permitam a sua utilização segura como material obturador e, portanto, são submetidos a testes tecnológicos que caracterizam e garantem vários aspetos: consistência, manipulação, tempo de trabalho, caracterização física após a mistura e presa. Podem também antecipar o comportamento clínico do material. Segundo a norma ISO standard 6876-2001<sup>12</sup>, os testes avaliam a consistência, o tempo de trabalho, o tempo de presa, a radiopacidade, a solubilidade e a desintegração e, ainda, as alterações dimensionais após a presa.

Depois desta fase, são necessários novos testes que incidem no comportamento biológico (testes biológicos, em culturas celulares, por exemplo) e clínico (utilização clínica em animais). Um outro aspeto importante é a avaliação da capacidade antibacteriana do material.

Há, portanto, várias abordagens para testar a biocompatibilidade dos materiais endodônticos, nomeadamente os cimentos: culturas celulares, implantes subcutâneos, implantes intra-ósseos, estudos *in vivo* da tolerância dos tecidos (utilização dos materiais em tratamentos endodônticos de dentes em animais)<sup>13,14,15</sup>.

Há diversos cimentos de obturação disponíveis comercialmente, alguns utilizados há décadas (por exemplo, à base de óxido de zinco eugenol), sofrendo apenas algumas alterações na sua composição, outros de introdução mais recente (por exemplo, à base de resina de metacrilato), ainda com poucas provas dadas clinicamente. A biocompatibilidade do cimento é extremamente importante, uma vez que este material pode contactar diretamente os tecidos vivos da região periapical, nomeadamente o tecido ósseo do alvéolo que aloja o dente, e desta forma pode ou não permitir a



resolução de uma lesão óssea pré-existente, ou pode originar uma reação inflamatória em tecido ósseo saudável.

Assim, aproveitando os excelentes recursos existentes no Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, desenvolvemos este estudo em culturas celulares, com o objetivo de comparar a citotoxicidade de diversos cimentos de obturação disponíveis comercialmente e avaliar os seus efeitos nas células do tecido ósseo, osteoblastos e osteoclastos. Analisou-se a resposta celular a uma gama de concentrações de extratos dos cimentos e durante diferentes tempos de exposição, de modo a obter informação sobre o perfil de toxicidade de cimentos endodônticos de diferentes composições.

## Bibliografia

---

<sup>1</sup>Grossman LI et al. Roentgenological and clinical evaluation of endodontically treated teeth. *Oral Surg, Oral Med and Oral Pathol* 1964; 17: 368-74

<sup>2</sup>Sjögren U et al. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endodon* 1990; 16: 498-504.

<sup>3</sup>Eriksen HM, Bjertness E. Prevalence of apical periodontitis and results of endodontic treatment in middleaged adults in Norway. *Endodon and Dental Traumatol* 1991; 7: 1-4.

<sup>4</sup>Friedman S. Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. In: Örstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*, 1st ed. 1998; Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 367-401.

<sup>5</sup>Imura N et al. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endodon* 2007; 33: 1278-82.

<sup>6</sup>Benenati F et al. A radiographic recall evaluation of 894 endodontic cases treated in a dental school setting. *J Endodon* 2002; 28: 391- 95.

<sup>7</sup>Dammaschke T et al. Long-term survival of root-canal-treated teeth: a retrospective study over 10 years. *J Endodon* 2003; 29: 638-43.

<sup>8</sup>De Moor RJG et al. Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population. *Int Endodon J* 2000; 33: 113- 20.

<sup>9</sup>Gilbert GH et al. Outcomes of root canal treatment in Dental PBRN practices. *Gen Dent* 2010; 58:28.

<sup>10</sup>Torabinejad M et al. Outcomes of root canal treatment and restoration, implant-supported single crowns, fixed partial dentures, and extraction without replacement: a systematic review. *J Prost Dentist* 2007; 98: 285-311.

<sup>11</sup>Eleman RF, Pretty I. Comparison of the success rate of endodontic treatment and implant treatment. *Int Scholarly Reseach Network* 2011; article ID 640509.

<sup>12</sup>International Standard ISO 6876:2001 Dental root canal sealing materials.

<sup>13</sup>Bernáth M, Szabó J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endodon J* 2003; 36: 256-61.

<sup>14</sup>Ingle JI et al. The obturation of radicular space. In: Ingle, Bakland and Baumgartner ed. *Ingle's Endodontics* 6<sup>th</sup> ed 2008; BC Becker Inc. 1053- 87.

<sup>15</sup>Hauman CHJ and Love RM. Biocompatibility of dental material used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root canal filling materials. *Int Endod J* 2003; 36: 147-60.

# INTRODUÇÃO



O princípio da obturação do espaço do canal radicular é genérica e naturalmente aceite. No entanto, tem surgido a discussão sobre a importância e até sobre a necessidade de obturar os canais radiculares. Há atualmente alguma controvérsia sobre a influência da obturação *versus* restauração no sucesso/insucesso do tratamento endodôntico<sup>1-13</sup>. De acordo com alguns autores<sup>2,3,4</sup>, ambos são importantes para o sucesso, posição com que concordamos.

O sucesso ou insucesso do tratamento endodôntico radical baseia-se tradicionalmente na desinfecção do sistema de canais e na necessidade de obter um selamento o mais hermético possível, para preservar o saneamento obtido durante o preparo canalar ou manter as condições assépticas previamente existentes, como é o caso dos dentes com vitalidade. Um estudo recente de Sabeti et al<sup>1</sup> comprovou que o sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação dos microrganismos, da resposta do hospedeiro e do selamento coronal dos canais radiculares. Segundo estes autores, é mais importante a restauração coronal para impedir a penetração de microrganismos, que a obturação canalar, sendo que esta continua a ser recomendada porque reduz o espaço e a nutrição para a multiplicação de microrganismos que eventualmente tenham permanecido no canal. Saunders et al<sup>5</sup> (1994) e Ray et al<sup>6</sup> (1995) também concluíram que a qualidade da restauração coronal é significativamente mais importante que a do tratamento endodôntico. Pelo contrário, Riccucci et al<sup>7</sup> referem que a restauração não é crítica para o resultado do tratamento endodôntico. Numa posição intermédia, vários autores defendem que a combinação de um tratamento endodôntico e restauração adequados permitem uma elevada taxa de sucesso, mas consideram que o fator mais importante para o sucesso é a qualidade do tratamento endodôntico<sup>8,9,10,11</sup>. Dentes com uma obturação deficiente, independentemente da qualidade da restauração, apresentavam uma prevalência significativamente mais elevada de periodontite apical que os dentes obturados adequadamente. No entanto, a qualidade da restauração também influencia o resultado do tratamento, possivelmente prevenindo a re-infeção do canal radicular. Chugal et al<sup>12</sup> e Ng et al<sup>13</sup>, em revisões extensivas da literatura sobre os fatores clínicos que influenciam o resultado do tratamento endodôntico apontaram a obturação do canal (limite apical e condensação) e a restauração pós tratamento como fatores que afetam significativamente o resultado, sendo o outro fator a presença ou ausência de lesão apical pré-operatória.

Independentemente das teorias, parece ser fundamental para uma maior taxa de sucesso a obturação do canal com um material densamente compactado, até ao limite apical da preparação, sem extrusão do material obturador para os tecidos periapicais e prevenindo a re-infeção com uma restauração coronal de boa qualidade.

Depois de um correto diagnóstico, os canais radiculares são preparados biomecanicamente, através da instrumentação, irrigação e, se necessário, medicação intracanal. O clínico estabelece assim a forma e tamanho adequados do canal radicular, para depois proceder à sua obturação. O objetivo da obturação é prevenir a re-infeção do canal radicular, utilizando materiais e técnicas que possibilitem o total preenchimento de todo o sistema de canais e promovam um selamento que impeça a penetração de fluidos desde o segmento apical do canal até à embocadura dos canais<sup>14</sup>.

Sundqvist e Figdor<sup>15</sup> atribuíram três funções primárias à obturação: selamento contra a penetração de bactérias provenientes da cavidade oral; isolamento dos microrganismos remanescentes; obturação completa que previna a infiltração de fluidos que podem servir de nutrientes para as bactérias.

A técnica clássica de obturação associa um cimento obturador com um material central sólido. O material central funciona como um núcleo para o cimento. Este cimento deve preencher os espaços vazios e aderir às paredes da dentina. Na obturação existe o risco de que o cimento extrua e contacte com os tecidos vivos da região periapical.

Grossman, um dos fundadores da especialidade de Endodontia, resumiu as propriedades mecânicas, físicas e biológicas ideais dos materiais de obturação segundo a lista da tabela 1<sup>16</sup>.

Tabela 1: Propriedades ideais de um material de obturação segundo Grossman

<p>Deve ser fácil de introduzir no sistema de canais</p> <p>Deve selar o canal lateral e apicalmente</p> <p>Não deve contrair depois de endurecer</p> <p>Deve ser impermeável aos fluidos</p> <p>Deve ser bacteriostático (ou, pelo menos, não promover o crescimento bacteriano)</p> <p>Deve ser radiopaco</p> <p>Não deve pigmentar a estrutura dentária</p> <p>Não deve ser irritante para os tecidos periapicais</p> <p>Deve ser estéril ou fácil e rapidamente esterilizável imediatamente antes de ser utilizado</p> <p>Deve ser fácil de remover do canal se necessário</p>
--

Alguns autores foram acrescentando outras propriedades, nomeadamente:

- Não desencadear resposta imune nos tecidos periapicais;
- Não deve ser mutagénico nem carcinogénico<sup>17,18</sup>.

### **Material central sólido**

#### Guta-percha

É, sem dúvida, o núcleo sólido universalmente mais utilizado.

Em 1867, Bowman<sup>19</sup> introduziu o uso da gutta-percha em Endodontia. A gutta-percha é um polímero do metilbutadieno ou isopreno (1,4 poliisopreno), sendo assim um isómero da borracha, mas mais dura, mais quebradiça e menos elástica do que esta. Enquanto a borracha natural é um cis-poliisopreno, possuindo agrupamentos CH<sub>2</sub> do mesmo lado da ligação dupla, a gutta-percha é um trans-poliisopreno, o qual apresenta os seus agrupamentos CH<sub>2</sub> em lados opostos da ligação dupla. A gutta-percha é obtida a partir da coagulação do látex de árvores da Malásia, dos géneros *Payena* ou *Palaquium*, da família *Sapotaceae*.

Em 1942, C.W. Bunn<sup>20</sup> descreveu que a gutta-percha pode apresentar quimicamente duas formas cristalinas distintas: alfa e beta. A forma alfa é a que é naturalmente extraída da árvore. A maioria das guttas disponíveis comercialmente encontra-se na forma beta. A forma alfa é quebradiça à temperatura ambiente e quando aquecida torna-se pegajosa,

aderente e com maior escoamento. A temperatura de fusão é 65°C, sendo esta a guta utilizada nas técnicas termoplásticas. A forma beta é estável e flexível à temperatura ambiente e quando aquecida não tem adesividade e tem menor escoamento que a forma alfa. A sua temperatura de fusão é de 56°C.

A forma comercial da guta-percha mais comum é em cones, que podem ser calibrados ou não. Os cones calibrados têm diâmetros e conicidades determinados. O diâmetro da ponta de um cone de guta é denominado  $D_0$ . É um diâmetro virtual que consiste na projeção da conicidade do cone até à sua extremidade. Os diâmetros em  $D_0$ , expressos em centésimas de milímetro, correspondem aos números padronizados (ISO) e variam entre 15 e 140. O diâmetro dos cones aumenta 0,05mm até ao nº 60 e 0,10mm a partir daqui até ao nº 140. No entanto, existem pequenas variações nos diâmetros de ponta, inerentes ao processo de fabrico. As conicidades podem ser de 0.02, 0.04 e 0.06.

A composição básica dos cones de guta-percha inclui guta-percha (19 a 20%), óxido de zinco (60 a 75%), substâncias para conferir radiopacidade como o sulfato de bário (1,5 a 17%) e outras substâncias como resinas, ceras e corantes (1 a 4%). Alguns fabricantes adicionam ainda agentes anti-microbianos como o hidróxido de cálcio<sup>21</sup>, clorhexidina<sup>22</sup> ou iodoformio<sup>23</sup>.

A guta-percha tem uma aceitável biocompatibilidade e baixa toxicidade<sup>24,25</sup>. A guta-percha pura não é citotóxica, no entanto, os cones de guta-percha apresentam alguma citotoxicidade, provavelmente devido aos outros componentes adicionados, nomeadamente o óxido de zinco que é libertado ao longo do tempo<sup>26,27</sup>.

A obturação com guta-percha obriga ao uso de cimentos seladores, e ainda que a guta possa ter alguma toxicidade, os cimentos são normalmente o elemento mais tóxico da obturação.

As vantagens e as desvantagens dos cones de guta-percha são apresentadas na tabela 2.



Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos cones de guta-percha<sup>28</sup>

<u>Vantagens:</u>	<u>Desvantagens:</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasticidade que permite uma fácil adaptação às irregularidades do canal, quando utilizados em várias técnicas de obturação</li> <li>- São bem tolerados pelos tecidos periradiculares</li> <li>- Radiopacos</li> <li>- Podem ser facilmente plastificados por meios físicos e químicos</li> <li>- Estabilidade dimensional</li> <li>- Insolubilidade</li> <li>- Não alteram a cor da coroa do dente quando usados no limite coronário adequado</li> <li>- Facilmente removidos do canal se necessário</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pequena resistência mecânica à flexo-compressão (rigidez), o que dificulta o seu uso em canais curvos e atresiadados</li> <li>- Pouca adesividade, o que exige a complementação da obturação com um cimento</li> <li>- Podem ser deslocados pela pressão, podendo originar sobre-obturação durante a condensação</li> </ul>

A guta-percha expande ligeiramente (0,2%) quando aquecida, o que pode ser vantajoso num material de obturação. Esta propriedade foi aproveitada para desenvolver técnicas de obturação que utilizam guta-percha aquecida (injetável, aquecida no interior do canal ou em transportadores).

### Resilon®

No intuito de ultrapassar algumas das limitações da guta-percha, durante décadas foram testadas várias resinas sintéticas, mas só com a introdução no mercado do Resilon® surgiu uma alternativa, aparentemente viável, à guta-percha. Este novo material, desenvolvido em 2003 pela empresa Petron Clinical Technologies, é um polímero sintético termoplástico. Com base num polímero do poliéster, contem vidro bioativo e substâncias radiopacas. Tem propriedades físicas semelhantes à guta-percha, manuseia-se da mesma forma e para a sua remoção utiliza-se o calor ou solventes. Apresenta comercialmente as mesmas apresentações que a guta-percha: cones calibrados, cones auxiliares, bastões para técnicas termoplásticas. A grande vantagem, referida pelo fabricante, parece ser o tipo e extensão da adesão do material central sólido às paredes da dentina – através de um *primer* resinoso - e ao cimento de obturação, que neste caso tem de ser um cimento com resina. Surge o conceito de obturação em “monobloco”, porque a adesão não é apenas física mas também química, entre as paredes da dentina, o

Resilon® e o cimento. As vantagens desta obturação em “monobloco” seriam um melhor selamento apical e coronal e o isolamento de bactérias residuais<sup>29</sup>.

### **Cimentos de obturação**

Os cimentos são responsáveis pelas principais funções da obturação: selar hermeticamente o sistema de canais radiculares, isolar as bactérias remanescentes e preencher as irregularidades do canal preparado, nomeadamente os espaços entre a superfície da dentina e o material central sólido. Tradicionalmente, o que se esperava do cimento era que aderisse quer à dentina quer à guta-percha, no entanto os novos cimentos são desenvolvidos com o objetivo de que penetrem nos túbulos dentinários e estabeleçam uma melhor adesão à dentina e ao material central sólido.

Grossman<sup>16</sup> listou os requisitos e características de um bom cimento de obturação (tabela 3).

Tabela 3: Características dos cimentos de obturação segundo Grossman

<p>Deve ser pastoso quando misturado para proporcionar boa adesão com as paredes do canal depois de seco</p> <p>Deve proporcionar selamento hermético</p> <p>Deve ser radiopaco</p> <p>As partículas de pó devem ser muito finas para facilmente se misturarem com o líquido</p> <p>Não deve contrair depois de polimerizar</p> <p>Não deve pigmentar a estrutura dentária</p> <p>Deve ser bacteriostático (ou, pelo menos, não promover o crescimento bacteriano)</p> <p>Deve ser insolúvel nos fluidos tecidulares</p> <p>Deve ser bem tolerado pelos tecidos, isto é, não irritante para os tecidos peri-radiculares</p> <p>Deve ser solúvel num solvente comum se for necessário remover a obturação do canal</p>
---

Outros autores acrescentaram ainda:

- não deve provocar uma resposta imune nos tecidos peri-radiculares;
- não deve ser mutagénico nem carcinogénico<sup>17,18</sup>.

Ingle e Taintor<sup>20</sup> afirmaram que a reação inicial dos tecidos periapicais a qualquer cimento de obturação é inflamatória, no entanto há uma regeneração celular quando o cimento polimeriza, a menos que continue a desintegrar-se, libertando componentes tóxicos.

Têm sido utilizadas várias fórmulas químicas nos cimentos de obturação. Classicamente, os cimentos são classificados, de acordo com a sua constituição, em:

- cimentos à base de óxido de zinco-eugenol (Roth, Kerr PCS, Procosol, Endometasona, Tubliseal, etc)
- cimentos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex, Apexit)
- cimentos à base de resina (AH Plus, Epiphany, Endorez, Acroseal)
- cimentos à base de silicone (RoekoSeal, GuttaFlow)
- cimentos à base de ionómero de vidro (KetacEndo)

#### Cimentos à base de óxido de zinco eugenol

Há muitos anos que os cimentos à base de óxido de zinco eugenol, na sua composição mais básica (óxido de zinco no pó e eugenol como líquido) ou noutras formulações (adição de resinas, bário, paraformaldeído, corticoides, etc) são dos mais utilizados na obturação dos canais radiculares. A grande vantagem destes cimentos é o facto de não contraírem e preencherem adequadamente todos os espaços. São ótimos selantes marginais. A desvantagem é a solubilidade nos fluidos tecidulares e alguma toxicidade<sup>30</sup>.

O endurecimento ou presa do cimento dá-se por reação de ácido-base, em que o óxido de zinco atua como base e o eugenol como ácido, formando um sal quelato de eugenelato de zinco e água<sup>28</sup>. A água é essencial e funciona como um acelerador da reação de presa. Após a presa do material, 5% da quantidade original de eugenol permanece livre.

O eugenol possui atividade anti-bacteriana, efeito anestésico e anti-inflamatório. É também bactericida em concentrações relativamente altas ( $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  mol/L). Os iões de

zinco ( $Zn^{2+}$ ) também podem inibir o crescimento bacteriano, uma vez que em concentrações elevadas são inibidores enzimáticos e interferem no metabolismo bacteriano. No entanto, quer o eugenol quer os iões de zinco podem ter efeito citotóxico<sup>31,32</sup>. Os efeitos biológicos do eugenol variam com a sua concentração. Doses elevadas de eugenol inibem o crescimento e a respiração celular, podendo levar à morte; promovem alterações vasculares, como a vasodilatação; são neurotóxicas. No entanto, baixas concentrações têm propriedades farmacológicas desejáveis, como ação anti-inflamatória e analgésica<sup>33</sup>. Alguns autores sugeriram a substituição do eugenol por ácidos gordos para prevenir os seus efeitos citotóxicos<sup>34</sup>. Parece, no entanto, que a quantidade de eugenol libertada de um cimento de óxido de zinco eugenol para além do ápice é muito pequena (na gama das concentrações com efeitos benéficos) e diminui ao longo do tempo<sup>35</sup>. Contudo, a quantidade libertada vai depender também da técnica de obturação utilizada e do limite da obturação. As técnicas termoplásticas, por exemplo, por um lado impedem a libertação de eugenol porque proporcionam um selamento mais hermético, mas por outro lado são mais propícias a que ocorra extravazamento de material obturador, e portanto aumenta a área de contacto do cimento com os tecidos periapicais.

A quantidade de eugenol que é libertado e a sua toxicidade parecem ser maiores nos cimentos que utilizam a mistura convencional de óxido de zinco eugenol que nos cimentos que utilizam pó de óxido de zinco reforçado<sup>36</sup>.

Por outro lado, o eugenol produz uma expansão do volume da guta-percha. Aumentando a proporção do eugenol no cimento, aumenta a expansão do volume da guta-percha<sup>37</sup>, o que pode traduzir-se numa melhor capacidade seladora, mas aumentar os riscos de efeitos indesejáveis do eugenol.

O eugenol tem ainda uma desvantagem, ainda que de menor importância: inibe a reação de polimerização das resinas, o que pode condicionar o tipo de restauração<sup>38</sup>. No entanto, este efeito pode ser minimizado adotando os procedimentos adequados.

Há ainda outros componentes que podem ser citotóxicos, como a resina adicionada para aumentar a adesão à dentina, paraformaldeído para efeito anti-microbiano e mumificante, germicidas para ação antiséptica e corticoides para inibir a inflamação.

Um estudo de Sunzel et al <sup>39</sup> mostrou que a incorporação de zinco reduz significativamente a toxicidade das resinas e resinas ácidas (que são anti-microbianas) proporcionalmente ao aumento da concentração de zinco.

O formaldeído e/ou paraformaldeído, mesmo em pequenas quantidades podem ser irritantes e impedir ou retardar o processo regenerativo. Alguns cimentos de obturação contêm estas substâncias ou, mesmo que não esteja presente nas suas formulações, podem libertar moléculas de formaldeído durante a reação química de polimerização<sup>40</sup>. Além do efeito tóxico *per si*, parece potenciar o efeito tóxico do eugenol.

O formaldeído é classificado (pela International Agency for Research on Cancer) como carcinogénico para os animais, mas a evidência do efeito carcinogénico no Homem é limitada<sup>41</sup>. No entanto, os elevados teores de paraformaldeído em alguns cimentos de óxido de zinco eugenol pode ser motivo de preocupação<sup>42</sup>. Já foi demonstrado que o efeito desinfetante do canal, a longo prazo, promovido pelo formaldeído é pouco significativo <sup>43</sup>, com o risco de originar reações adversas, nomeadamente neurotoxicidade<sup>44</sup>, parestesia do nervo alveolar inferior<sup>45,46</sup>, urticária<sup>47</sup> e reações anafiláticas<sup>48,49,50</sup>.

### Cimentos à base de hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio foi introduzido na endodontia por Herman em 1920 pela sua capacidade de regeneração pulpar<sup>51</sup>. Devido aos efeitos biológicos benéficos que lhe são atribuídos, passou a ser utilizado em endodontia para recobrimento pulpar, medicação intra-canal, em técnicas de apexificação e na composição dos cimentos para obturação definitiva dos canais radiculares. As duas principais razões para usar o hidróxido de cálcio como material de obturação são a estimulação dos tecidos periapicais para se manterem sãos ou para promover a sua regeneração, e pelos seus efeitos anti-bacterianos (ainda que inferiores a outros cimentos, nomeadamente à base de óxido de zinco-eugenol ou à base de resina)<sup>52</sup>.

Os mecanismos de ação exatos são desconhecidos, mas foram propostos os seguintes:

1. O hidróxido de cálcio é anti-bacteriano devido à libertação de iões hidroxil<sup>53</sup>. O seu elevado pH promove a reparação e calcificação dos tecidos. Inicialmente há

- uma resposta degenerativa na zona circundante, que é depois seguida por mineralização e ossificação<sup>54</sup>;
2. O pH alcalino do hidróxido de cálcio neutraliza o ácido láctico dos osteoclastos e previne a dissolução dos componentes minerais do dente. Este pH também ativa a fosfatase alcalina, que tem um importante papel na formação de tecido ósseo<sup>55</sup>;
  3. O hidróxido de cálcio desnatura as proteínas encontradas no canal, tornando-as menos tóxicas;
  4. O hidróxido de cálcio ativa a reação da adenosina trifosfatase cálcio dependente, associada à formação de tecido duro<sup>55,56</sup>;
  5. O hidróxido de cálcio difunde através dos túbulos dentinários e pode atingir o ligamento periodontal, detendo a reabsorção radicular externa e acelerando a cicatrização<sup>53,57</sup>.

Para ter um efeito terapêutico, o hidróxido de cálcio tem que ser dissociado em íões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e íões hidroxil ( $\text{OH}$ ). Portanto, para um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio ser terapêutico, tem de haver libertação destes íões, o que pode afetar a integridade estrutural do cimento e comprometer o selamento a longo prazo<sup>58</sup>. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* comprovam que este fenómeno ocorre e pode mesmo induzir uma resposta inflamatória dos tecidos periapicais<sup>52,59,60</sup>. No entanto, há também evidências de que a dissolução do cimento de hidróxido de cálcio não é superior a outros tipos de cimento<sup>61</sup>. A reação de polimerização destes cimentos é complexa e pouco homogênea; o contacto com a humidade origina uma superfície dura, mas a zona mais profunda da mistura pode permanecer com menor consistência.

Estes cimentos são geralmente caracterizados como tendo uma boa citocompatibilidade<sup>62,63</sup>, mas a falta de dureza física é motivo de preocupação.

Há algumas controvérsias quanto à biocompatibilidade dos cimentos à base de hidróxido de cálcio, que poderá ser atribuída aos métodos de avaliação, no entanto, a maior parte dos estudos conclui que estes cimentos apresentam resultados aceitáveis comparativamente a outros cimentos<sup>64</sup>.

## Cimentos à base de resina

### Resinas epóxicas

Dentro deste grupo, os cimentos que atingiram mais sucesso foram os da série AH. O protótipo foi desenvolvido há mais de 50 anos por Andre Schroeder na Suíça<sup>65</sup>, e é uma resina bis-fenol que usa metamina para polimerização (AH26). Como a metamina liberta formaldeído durante a reação de polimerização<sup>43</sup>, passou a usar-se como substituto uma mistura de aminas que permitia a polimerização sem a formação de formaldeído, sendo o produto comercializado como AH Plus. Um estudo de Cohen et al<sup>66</sup> comparou a libertação de formaldeído pelos dois cimentos e mostrou que o AH Plus liberta uma quantidade mínima comparativamente ao AH 26 (3,9 ppm/1347 ppm). Um estudo mais recente de Evcil et al<sup>67</sup>, não detetou formaldeído no AH Plus. Além disso, o AH Plus, ao contrário do AH 26, parece não ter efeito estrogénico, ainda que ambos tenham na sua constituição bisGMA<sup>68</sup>. Outras vantagens do AH Plus são a rápida polimerização, maior radiopacidade, maior facilidade de remoção e baixa solubilidade<sup>69,70</sup>.

A popularidade deste tipo de cimento deveu-se em grande parte ao facto de não conter eugenol e portanto não interferir com as restaurações em resina.

Uma outra fórmula com resina, até há pouco amplamente utilizada em todo o mundo, é o tipo resorcinol-formaldeído (Tratamento Spad, por exemplo)<sup>71,72</sup>. Este cimento é altamente anti-bacteriano, mas contrai e deixa uma tonalidade avermelhada na estrutura dentária envolvente. Como se preconizava a sua utilização sem cones de guta-percha e polimerizava numa massa muito dura e insolúvel, o re-tratamento destes casos era e é extremamente difícil. Além disso, como já referimos, o formaldeído é um componente citotóxico e que pode difundir-se para os tecidos periapicais, ainda que alguns autores considerem que a quantidade mínima de formaldeído nos cimentos de obturação é irrelevante sob o ponto de vista toxicológico, atendendo à elevada exposição e tolerância dos mamíferos a este componente<sup>43</sup>. No entanto, o formaldeído libertado dos cimentos de obturação, principalmente quando há extrusão do material para a região periapical, pode originar uma reação inflamatória periapical ou contribuir para a manutenção de uma lesão periapical pré-existente<sup>73</sup>.

### Resinas de metacrilato

Estes cimentos, extensivamente estudados nos últimos anos, vão já na quarta geração e o objetivo seria conseguir uma adesão física e química às paredes da dentina e ao material de obturação central<sup>29</sup>.

O EndoRez® faz parte deste grupo de cimentos. Baseado em uretanodimetacrilato (UDMA), semelhante a muitas resinas utilizadas em dentisteria para restauração. Tem algumas propriedades hidrofílicas que parecem melhorar o seu comportamento, mesmo na presença de humidade. Recentemente, o EndoRez® foi comercializado juntamente com cones de guta-percha revestidos com resina<sup>74</sup>, que por ligação ao cimento, proporcionariam melhor adesão e selamento. Este é o mesmo conceito dos novos produtos Ephiphany/Resilon® e RealSeal®<sup>75</sup>. Com este tipo de cimento, é aplicado um *primer* à superfície da dentina depois de esta ter sido limpa com um ácido para remover a *smear-layer*. De seguida, um cimento de dupla polimerização baseado em BisGMA, UDMA e metacrilatos hidrofílicos e com partículas radiopacas, liga-se às paredes de dentina através do *primer*. Para completar o preenchimento, são inseridos cones de Resilon®, em lugar da guta-percha. Então, o cimento liga-se à dentina via *primer* e há uma ligação química do cimento ao cone, o que originou o conceito de obturação homogénea, “monobloco”<sup>76</sup>. Um estudo de revisão recente<sup>77</sup> concluiu não haver, para já, vantagem na utilização destes cimentos.

### Cimentos à base de silicone

O Lee Endo-Fill® foi o primeiro cimento a testar as propriedades do silicone (amplamente utilizado noutras áreas da medicina dentária), nomeadamente a capacidade hidrofóbica, a estabilidade química e propriedades adesivas, como material de endodontia<sup>65</sup>. Apresentava alguma toxicidade, que aumentava com o tempo, provavelmente devido ao prolongado período de polimerização<sup>78</sup>.

O RoekoSeal Automix® é uma formulação mais recente deste tipo de cimento. O cimento é colocado por meio de um aplicador de câmara dupla, que mistura o cimento na dosagem apropriada. O material polimeriza por completo, sem contração, independentemente da humidade e temperatura<sup>28</sup>, apresentando bons resultados<sup>79</sup>.



O GuttaFlow® surgiu da tentativa de incorporar no cimento de obturação as qualidades da guta-percha. A guta-percha foi triturada em partículas muito pequenas e misturada nos componentes de um cimento à base de silicone. Uma das vantagens advogada é a sua capacidade de expandir ligeiramente (0,2%) durante a presa<sup>80</sup>, melhorando a capacidade seladora. Estudos recentes comprovam a boa capacidade seladora deste cimento, mas alertam para a possibilidade de extrusão para além do foramen apical<sup>81</sup>, pelo que o potencial risco para os tecidos periapicais tem de ser estudado.

### Cimentos à base de ionómero de vidro

Com pouca representação comercial (o Ketac-Endo® é o mais conhecido), os cimentos de ionómero de vidro tradicionais são constituídos por alumina, sílica e ácido polialcenóico e são autopolimerizáveis. Foram introduzidos no mercado há mais de 20 anos, e foram muito utilizados<sup>82</sup>, ainda que laboratorialmente tenham mostrado alguma infiltração e desintegração<sup>83</sup>. Mostraram propriedades anti-microbianas<sup>84,85</sup> e capacidade de adesão à estrutura dentária, mas parecem ativar a libertação de prostaglandinas nos tecidos periapicais<sup>86</sup>.

Estudos em culturas celulares com estes cimentos mostraram elevada citotoxicidade imediatamente após a mistura (provavelmente devido à libertação de alumínio), no entanto, após a presa, a toxicidade era baixa ou nula<sup>87</sup>.

### Novos materiais

Nos últimos anos, tem surgido na literatura referência a estudos com novos materiais:

- cimentos à base de fosfato de cálcio<sup>88,89</sup>;
- cimentos biocerâmicos (à base de cimento de Portland, que tem na sua constituição silicato de cálcio) e cuja principal vantagem é a sua elevada atividade anti-microbiana, apresentando boa capacidade seladora<sup>90</sup>, bioatividade (capacidade para formar uma camada de apatite tipo osso, estabelecendo uma ligação química com os tecidos vivos) e biocompatibilidade<sup>91,92</sup>. Resultam da tentativa de aproveitar os excelentes resultados do Agregado Trióxido Mineral (MTA), material de reparação tão amplamente utilizado nos últimos anos na Endodontia, ultrapassando algumas das suas limitações (dificuldade de manipulação, reduzido tempo de trabalho, dificuldade de remoção);

- adição de hidroxiapatite nano-estruturada aos cimentos de obturação<sup>93</sup>;
- a utilização de quitosano tem sido objeto de pesquisa nas Unidades Curriculares de Endodontia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, nomeadamente em trabalhos de doutoramento, pelo que esperamos num futuro próximo obter resultados relativos à sua utilização como material de obturação de canais.

### **Avaliação do comportamento biológico dos cimentos endodônticos**

Em 1930, Grove estabeleceu o limite apical da instrumentação e da obturação na junção cimento-dentinária (limite CDC). Mais tarde, Kuttler<sup>94</sup> estudou mais de 400 ápices e os seus estudos foram fundamentais para esclarecer a anatomia do canal radicular. Concluiu que a terminação apical do canal é formada por duas zonas cónicas: uma dentinária, com a base no orifício camaral do canal e o vértice na junção cimento-dentinária, e a outra cimentária, com o vértice na junção cimento-dentinária e a base no foramen apical. A união destas duas zonas é o local mais estreito do canal radicular - constrição apical - considerada como o ponto ideal para a terminação da preparação e obturação do canal.

Todos os materiais de obturação têm algum efeito irritante para os tecidos vivos, nomeadamente para os tecidos periapicais. Ainda que o objetivo durante a obturação dos canais radiculares seja que o material obturador fique confinado ao interior dos canais, há sempre o risco de extravasamento, maior ou menor conforme as técnicas de instrumentação e/ou obturação. Muitas vezes o material ultrapassa o foramen apical e entra em contacto direto com os tecidos periapicais, mesmo quando essa sobre-obturação não é visível na radiografia pós-operatória. Esse risco está aumentado nos casos de lesão apical crónica pré-operatória, uma vez que pode haver reabsorção do cimento apical, alterando a anatomia do ápice radicular, nomeadamente foramen apical e constrição apical. Portanto, o que importa saber acerca dos materiais de obturação, principalmente os cimentos de obturação, não é se são irritantes mas qual o grau de irritação que causam e durante quanto tempo.

Vários estudos<sup>95,96,97,98</sup> referem que a resposta dos tecidos aos diferentes tipos de cimentos de obturação varia consideravelmente e concluíram que a quantidade de cimento colocado no canal, a área de contacto entre o material e os tecidos e a interação

entre a dentina e produtos libertados dos cimentos, influenciam significativamente a resposta do tecido ao material obturador. Esta reação varia também com o tipo de substância presente ou libertada, a quantidade libertada e a velocidade de absorção.

Segundo Williams (1987)<sup>99</sup>, a biocompatibilidade é definida como a capacidade do material promover uma resposta apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contacto com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos.

Um material biocompatível deve estimular a cicatrização dos tecidos lesados sem causar efeitos adversos. Quase todos os cimentos endodônticos têm uma composição química complexa e são vários os aditivos que podem afetar a sua biocompatibilidade.

A biocompatibilidade dos cimentos foi caracterizada em vários parâmetros, tais como genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, compatibilidade dos tecidos e efeitos microbiológicos. No entanto, é impossível avaliar os materiais utilizando apenas um tipo de teste. As suas propriedades devem ser investigadas por uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo*, seguindo uma abordagem estruturada<sup>58</sup>.

Ainda que os testes *in vivo* sejam de grande interesse, a utilização de animais coloca problemas éticos e está atualmente sob grande discussão pública. Além disso, este tipo de experiência é cara, demorada e difícil de controlar<sup>100</sup>, pelo que a citotoxicidade é normalmente testada em células de cultura.

Os testes em culturas celulares, utilizados há mais de 30 anos na investigação da citotoxicidade dos materiais endodônticos, são mais simples, mais rápidos e mais económicos que outros métodos, e permitem testar um grande número de materiais utilizando as mesmas células e sob as mesmas condições. São fiáveis e facilmente reproduzíveis. Os testes *in vitro* têm a vantagem de utilizar um meio de cultura com composição *standard*, ambiente de incubação definido e condições de trabalho estéreis, e permitem uma avaliação qualitativa e quantitativa precisa<sup>98</sup>. No entanto, os resultados não podem ser extrapolados para a situação clínica. Os métodos que utilizam culturas celulares são muitas vezes mais sensíveis que os métodos *in vivo*, mas devem ser avaliados dentro dos limites de um teste de toxicidade aguda<sup>101</sup>.

A utilização de testes *in vitro* permite estudar os efeitos da libertação de componentes do material no sistema celular<sup>102</sup>. Podem ser utilizadas linhas celulares (por exemplo

HeLa, 3T3 ou L929) ou células humanas primárias (por exemplo fibroblastos ou células da polpa), sendo que estas últimas são consideradas mais relevantes para os estudos de biocompatibilidade<sup>103</sup>. As células primárias são caracterizadas por apresentarem uma grande capacidade de diferenciação, e ainda que sejam menos homogêneas e mais sensíveis que as linhas celulares, o seu comportamento torna-as mais facilmente comparáveis à mucosa oral<sup>104,105</sup>. Com este tipo de estudo podem avaliar-se vários aspetos biológicos: inibição do crescimento, determinação da dose efetiva (DE50), integridade da membrana, síntese de DNA, RNA ou proteínas e/ou alterações da morfologia celular por microscopia<sup>103,106,107,108,109</sup>.

Culturas celulares provenientes de diferentes órgãos podem apresentar respostas metabólicas diferentes que afetam a sua suscetibilidade a agentes tóxicos exógenos<sup>110</sup>.

A genotoxicidade resulta da presença de componentes DNA reativos que podem provocar alterações mutagénicas e carcinogénicas<sup>42</sup>. Os testes *in vitro* para avaliação da genotoxicidade podem ser diferenciados em estudos procaróticos/bacterianos (por exemplo: teste de Ames, teste *umu*) e eucarióticos (por exemplo: teste de inibição da síntese do DNA)<sup>111</sup>. Como vários materiais endodônticos têm uma elevada citotoxicidade, é importante que os testes de genotoxicidade quantifiquem simultaneamente a citotoxicidade, para evitar interpretações erradas dos resultados. Por outro lado, como muitos dos materiais têm uma elevada atividade anti-bacteriana, é necessário associar testes bacterianos com testes eucarióticos para obter resultados fiáveis. Ao contrário do efeito citotóxico, que provoca morte celular, a genotoxicidade não provoca obrigatoriamente a morte celular ou qualquer outro efeito imediato, mas a lesão do genoma celular pode diminuir significativamente a capacidade reparativa do tecido ou, a longo prazo, originar alterações neoplásicas<sup>112</sup>.

A exposição das células a agentes citotóxicos pode causar necrose ou apoptose. Durante a necrose, a célula começa por dilatar, a membrana plasmática colapsa e as células sofrem lise<sup>113</sup>. Portanto, a necrose é uma morte celular patológica. A apoptose é geralmente caracterizada por um colapso interno dos organelos, uma desintegração da membrana plasmática em corpos vesiculares apoptóticos e a destruição do material genético<sup>114</sup>. A eliminação celular das células por apoptose não é detetada pelo sistema imunológico, enquanto a eliminação do conteúdo intracelular das células necróticas para o espaço extracelular origina uma resposta inflamatória<sup>115</sup>. A apoptose é essencialmente

uma morte celular programada (“suicídio celular”) – auto-destruição das células, não afetando as células vizinhas<sup>116</sup>.

Neste trabalho experimental, utilizamos uma linha celular permanente MG63 (células “osteoblast-like”, provenientes de osteossarcoma humano) e também células humanas primárias - células mononucleares de sangue periférico e células mesenquimais de medula óssea, respetivamente para o estabelecimento de culturas de osteoclastos e osteoblastos.

Uma vez que avaliamos os efeitos dos cimentos de obturação em células ósseas, parece-nos relevante fazer uma revisão sobre o tecido ósseo e seu metabolismo.

### **Tecido ósseo/Metabolismo ósseo**

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células, responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da arquitetura óssea, são: os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e se localizam na sua periferia; os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos.

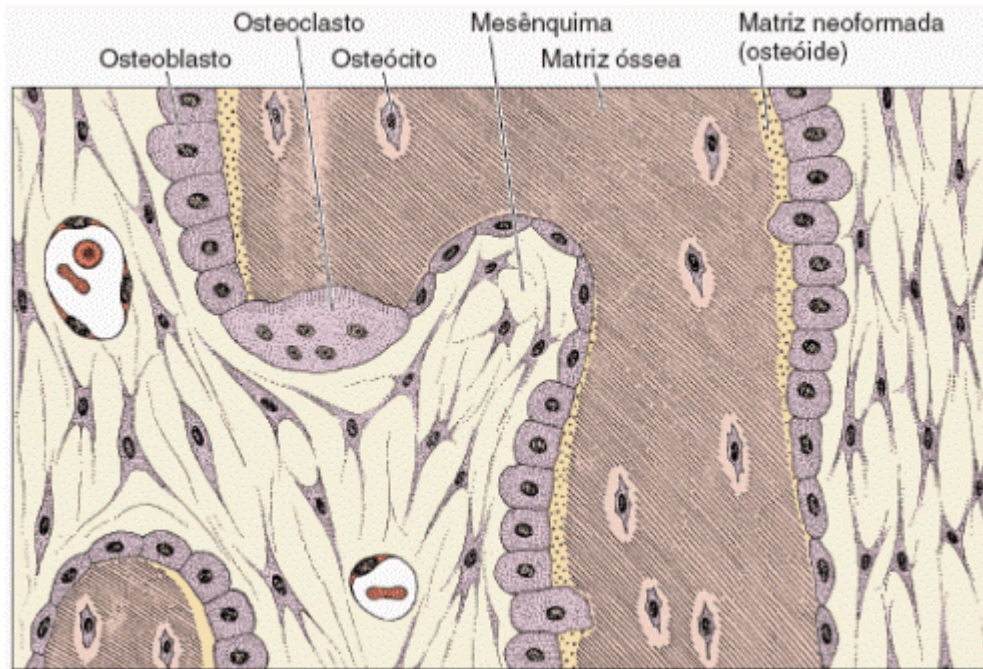
Para além das funções básicas de suporte, proteção e locomoção, os ossos constituem um importante reservatório de minerais. Sistemicamente, este mecanismo é controlado por fatores hormonais; localmente é controlado por forças mecânicas (incluindo os movimentos dentários), fatores de crescimento e citocinas.

### Matriz óssea

É constituída por uma parte mineral e uma parte orgânica.

A parte mineral ou inorgânica representa cerca de 67% do peso da matriz óssea. Os iões mais encontrados são o fosfato e o cálcio (fosfato de cálcio, organizado na forma de hidroxiapatite -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), mas existem também pequenas quantidades de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato.

A parte orgânica da matriz (33%) é formada por fibras de colagénio tipo I (28%) e pequenas quantidades (5%) de proteoglicanos e glicoproteínas (osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina, fosfoproteína, proteína específica do osso). As glicoproteínas do osso parecem estar envolvidas na mineralização da matriz.



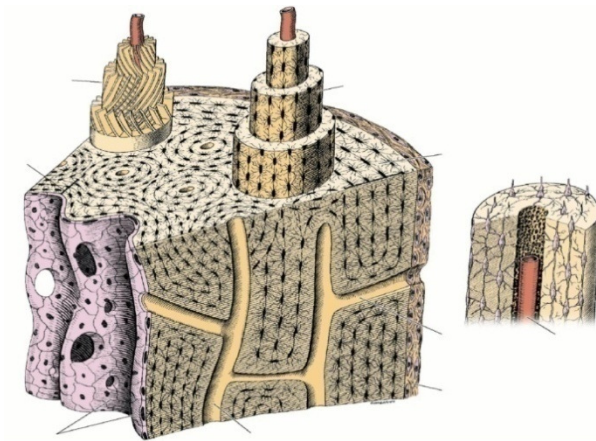
**Figura 1.** Esquema da ossificação intra-membranosa. Osteoblastos sintetizam a matriz orgânica que forma uma faixa – osteóide – que mineraliza, aprisionando alguns osteoblastos que se diferenciam em osteócitos (adaptado de Junqueira e Carneiro – *Histologia básica*)

### Periósteeo e Endósteeo

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogénicas e tecido conjuntivo, que constituem o endósteeo e periósteeo, respetivamente.

A camada mais superficial do periósteeo contém principalmente fibras colagénicas e fibroblastos. Na zona mais profunda, o periósteeo é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras. Estas multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando um papel importante no crescimento dos ossos e reparação de defeitos ou fraturas ósseas.

O endósteeo é geralmente constituído por uma camada de células osteogénicas achatadas, que revestem as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann.

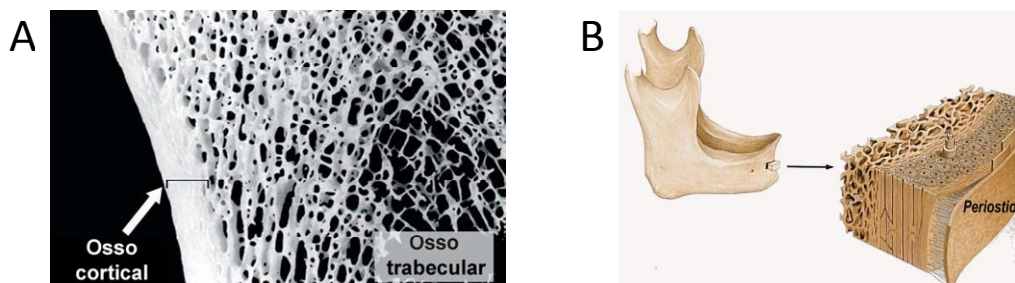


**Figura 2.** Esquema da parede da diáfise dos ossos longos. Aparecem três tipos de tecido ósseo lamelar: os sistemas de Havers e as lamelas circunferenciais externas e internas (adaptado de Junqueira e Carneiro – *Histologia básica*)

As principais funções do periósteo e endósteo são a nutrição do tecido ósseo e fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e recuperação do osso.

### Tipos de tecido ósseo

Macroscopicamente, o osso é constituído por osso compacto e osso esponjoso. Histologicamente, estes dois tipos são semelhantes.



**Figura 3.** (A) Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical e o osso trabecular (adaptado de Junqueira e Carneiro -*Histologia Básica*) (B) Ilustração do osso mandibular

Na classificação histológica do osso, distingue-se o osso imaturo ou primário e o maduro ou secundário. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. O primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação de fraturas, sendo temporário e substituído por osso secundário. As fibras de colagénio dispõem-se irregularmente, sem orientação definida. No secundário ou lamelar, as fibras estão organizadas em lamelas.

### Osteoblastos

São as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea - osteóide (composto essencialmente por colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas). São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando na mineralização da matriz extracelular. Uma vez aprisionado na matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado osteócito.

Os osteoblastos derivam de células mesenquimatosas multipotentes (*mesenchymal stem cells*) do estroma da medula óssea, que também originam condroblastos, fibroblastos, adipócitos e miócitos. A sua célula precursora é denominada pré-osteoblasto, uma célula não funcional, que posteriormente se diferencia em osteoblasto maduro, capaz de formar osso.

Os osteoblastos dispõem-se como uma camada celular na superfície do osso em formação, originando uma membrana que controla o fluxo de iões para dentro e para fora do osso. Quando termina a formação do osso, os osteoblastos ficam inativos e denominam-se “*lining cells*”, que parecem manter as junções comunicantes com os osteócitos, formando uma rede que controla a homeostasia mineral e assegura a vitalidade do osso<sup>117</sup>.

Os pré-osteoblastos e os osteoblastos apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina na superfície externa da membrana plasmática. Esta enzima, utilizada experimentalmente como marcador citoquímico, distingue os osteoblastos dos fibroblastos. Funcionalmente, parece clivar o fosfato dos compostos orgânicos. O fosfato libertado provavelmente contribui para iniciar e continuar o crescimento dos cristais minerais do osso.

Os osteoblastos produzem diversas moléculas importantes para o metabolismo ósseo, nomeadamente precursores do colagénio tipo I, osteocalcina (proteína não colagénica mais abundante na matriz óssea), sialoproteína óssea, proteoglicanos e segregam várias citocinas. Estas, que incluem fatores de crescimento, ajudam a regular o metabolismo celular. Os osteoblastos segregam ainda vários membros da superfamília de proteínas morfogenéticas do osso (*bone morphogenetic proteins* -BMP), incluindo BMP2, BMP7 e o fator de crescimento transformante beta (*transforming growth factor beta* - TGF- $\beta$ ), os fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (*insulin-like growth factors*- IGF-I



e IGF-II), o fator de crescimento derivado das plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF-AA) e o fator de crescimento dos fibroblastos beta (*fibroblast growth factor beta* - FGF- $\beta$ ). A presença destes fatores de crescimento locais, produzidos pelos próprios osteoblastos, pode estimular a formação óssea. As BMP e os TGF são sintetizados pelos osteoblastos, sob a forma de precursores inativos. A concentração local de TGF- $\beta$  é regulada por hormonas, como a paratormona e os estrogénios e por proteases osteoclásticas, que clivam as formas precursoras desses fatores de crescimento. Os TGF- $\beta$  estimulam a proliferação dos precursores dos osteoblastos e a síntese de proteínas da matriz óssea pelo osteoblasto maduro. Além disso, os TGF- $\beta$  que são libertados durante o processo de reabsorção óssea, participam na apoptose dos osteoclastos, constituindo um sinal para o fim da reabsorção e recrutam osteoblastos para a lacuna de reabsorção, permitindo iniciar o processo de formação de novo osso<sup>118</sup>. As BMP, estrutural e funcionalmente muito semelhantes aos TGF- $\beta$ , são reconhecidas por recetores diferentes, mas atuam na indução da diferenciação osteoblástica, aumentando a expressão do fator de transcrição Cbfa1 específico dos osteoblastos<sup>119</sup>. Outros fatores importantes, como IGF, PDGF e FGF, produzidos pelos osteoblastos, atuam no microambiente ósseo, estimulando a proliferação e a diferenciação dos precursores osteoblásticos ou aumentando a capacidade de síntese de novo material ósseo pelos osteoblastos maduros<sup>120</sup>.

Apesar de o “timing” da secreção e a complexa interação destes fatores de crescimento não estarem completamente esclarecidos, a combinação de IGF-I e TGF- $\beta$  e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-BB) aumenta consideravelmente a velocidade de formação e reparação óssea e será provavelmente muito importante no futuro da medicina dentária. Por exemplo, estas combinações poderão ser utilizadas para acelerar a cicatrização e crescimento ósseo após cirurgia periodontal ou para prevenir a doença periodontal pelo tratamento precoce de bolsas periodontais. Poderá ainda ser utilizada para melhorar a osteointegração após colocação de implantes.

Em condições fisiológicas que promovem a reabsorção, os osteoblastos podem ser estimulados pelas linfocinas (ex: interleucina 1, fator de necrose tumoral alfa) e pelas prostaglandinas para produzir interleucina 6. Os osteoblastos sob o estímulo da interleucina 6 também produzem as suas próprias enzimas hidrolíticas que participam na destruição e modificação da matriz desmineralizada ou cobertura pericelular, libertando os osteoblastos da sua própria matriz. Esta separação pode ser crítica durante

as fases iniciais do metabolismo ósseo, quando os osteoblastos têm de migrar e proliferar<sup>117</sup>. Portanto, estímulos como a atividade física ou movimentos dentários, afetam o metabolismo ósseo, atuando a nível dos osteoblastos<sup>121</sup>.

Geneticamente, o osteoblasto pode ser visto como um “fibroblasto sofisticado”, uma vez que todos os genes expressos nos fibroblastos podem ser encontrados nos osteoblastos. Apenas dois fatores de transcrição específicos dos osteoblastos foram identificados: o fator de transcrição Cbfa1 (*core binding factor a1*) e o fator de transcrição para a calcitonina, uma molécula que inibe a função osteoclástica. O Cbfa1 desempenha um papel central na diferenciação osteoblástica. Este fator de transcrição é o marcador mais precoce e específico da osteogênese, pois induz a diferenciação dos osteoblastos, controla a formação de material ósseo pelos osteoblastos diferenciados e regula a expressão da osteocalcina<sup>122</sup>. Ratos deficientes em Cbfa1 apresentam um esqueleto apenas formado por cartilagem, pois a diferenciação osteoblástica está comprometida<sup>123</sup>. Estes ratos são igualmente desprovidos de osteoclastos, o que demonstra a relação dinâmica que existe entre estes dois tipos de células vitais para o tecido ósseo, evidenciando a necessidade da presença de osteoblastos para que ocorra a diferenciação dos osteoclastos. Atualmente não são ainda conhecidos os detalhes moleculares que controlam a expressão do Cbfa1. Sabe-se, no entanto, que algumas BMP podem induzir a expressão de Cbfa1 *in vitro*<sup>122</sup>. Foi também demonstrado que o TGF- $\beta$  controla a diferenciação dos osteoblastos e modula a expressão do gene que codifica para o Cbfa1, e que outros fatores, como o FGF, também são importantes na diferenciação dos osteoblastos.

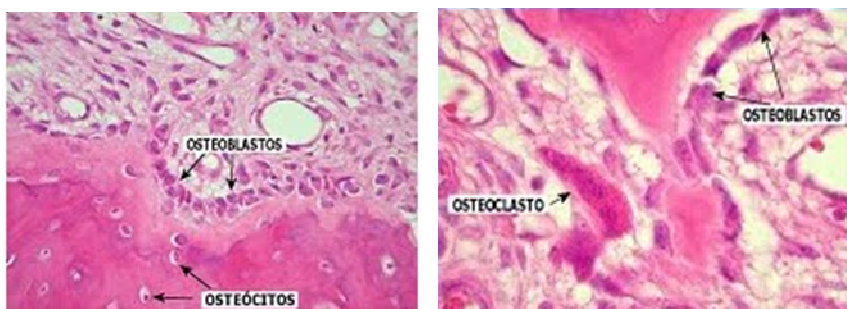
### Osteócitos

À medida que os osteoblastos produzem a matriz óssea, alguns ficam isolados no seu interior e são chamados osteócitos. São, portanto, as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna tem apenas um osteócito. Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contactos entre os osteócitos e com os osteoblastos da superfície do osso. Através destas junções comunicantes, podem passar pequenas moléculas e iões de uma célula para outra. Este complexo osteoblasto-osteócito é essencial para a manutenção e vitalidade da matriz óssea, apesar da pequena atividade de síntese, sendo que a morte dos

osteócitos é seguida de hipermineralização (esclerose) e morte do osso. Este osso não vital é reabsorvido e substituído durante o metabolismo ósseo.

Estas células, com a sua ampla distribuição ao longo da matriz óssea e elevado grau de interconectividade, são sensíveis a estímulos ambientais e mecânicos. Transformam esses estímulos em sinais bioquímicos de formação ou reabsorção óssea, conduzindo à deposição ou remoção de minerais das lacunas, respetivamente. Portanto, são responsáveis quer pela manutenção da matriz óssea, quer pela libertação de cálcio e fósforo do osso mineralizado para a corrente sanguínea<sup>124</sup>.

O número de osteoblastos que passam a osteócitos depende da velocidade de formação óssea: quanto mais rápida a formação óssea, maior o número de osteócitos por unidade de volume. Regra geral, o osso embrionário e o osso reparativo têm mais osteócitos que o osso lamelar.



**Figura 4.** Imagem histológica representativa de cada tipo celular que constitui o osso (in anatpat.unicamp.br)

### Osteoclastos

São células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas. Muitas vezes, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo, encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, em depressões da matriz escavadas pela atividade osteoclástica e conhecidas como lacunas de Howship. Citoquimicamente, caracterizam-se por apresentar a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) dentro das vesículas citoplasmáticas e vacúolos, o que os distingue de outras células gigantes e macrófagos.

A atividade dos osteoclastos é essencial para a reabsorção fisiológica do osso durante o crescimento e remodelação do esqueleto, bem como para manter a homeostasia do cálcio. São também ativos durante a erupção dentária.

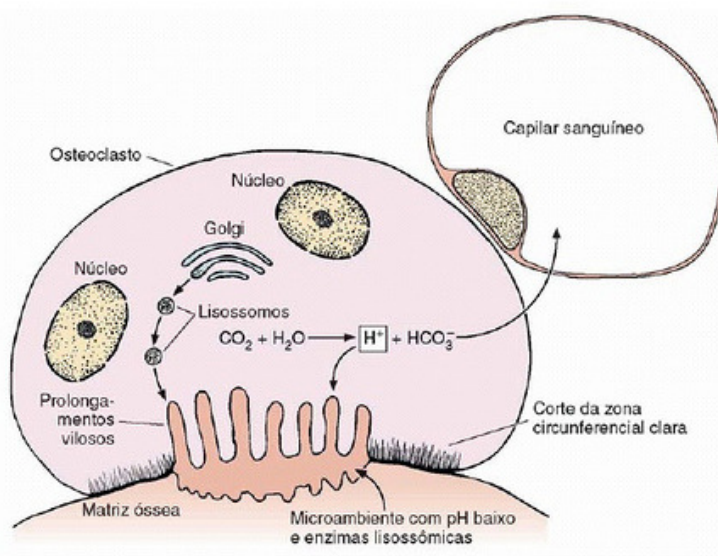
Estas células têm origem em células hematopoiéticas da linhagem dos monócitos (*hematopoietic stem cells*) que, em contacto com o tecido ósseo, se fundem para formar os osteoclastos multinucleados. Os osteoclastos apresentam uma morfologia característica - são células multinucleadas que desenvolvem um citoesqueleto preparado para estabelecer um microambiente estanque entre a célula e o osso, para o qual segregam ácidos e enzimas líticas.

A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares. Circundando essa área, existe uma zona citoplasmática, *clear zone*, pobre em organelos mas com muitos filamentos de actina. A *clear zone* é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea e cria um microambiente isolado, onde tem lugar a reabsorção óssea. Os osteoclastos segregam para o interior deste microambiente ácido ( $H^+$ ), colagenase, catepsina K (CATK) e outras enzimas líticas que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. Este processo é mediado por uma bomba de  $H^+$ , a  $H^+$ -adenosina trifosfatase ( $H^+$ ATPase) vacuolar<sup>125</sup>. O meio ácido solubiliza o mineral ósseo; subsequentemente, a matriz orgânica desmineralizada é degradada por ação de várias enzimas líticas, nomeadamente a protease CATK e a TRAP. Os produtos de degradação óssea são endocitados pelo osteoclasto, transportados e libertados para o meio extracelular através da superfície celular não reabsortiva<sup>126</sup>.

A compreensão do mecanismo da osteoclastogénese teve um grande avanço nos últimos anos. A regulação da osteoclastogénese (diferenciação dos precursores mononucleares em osteoclastos) é modulada pelo fator de estimulação de colónias de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor* – MCSF) e pelo ligando do receptor de activação do fator nuclear kappa beta (NF-kB – RANKL), produzido essencialmente pelos osteoblastos. Este liga-se ao recetor RANK, da família do fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor* – TNF), localizado na membrana das células precursoras hematopoiéticas<sup>127,128</sup>. O MCSF e o RANKL são necessários para induzir a expressão dos genes que caracterizam a linha osteoclástica, incluindo os já mencionados TRAP e CATK, bem como o recetor da calcitonina e a  $\beta_3$ -integrina, conduzindo ao

desenvolvimento de osteoclastos maduros<sup>129</sup>. A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel, produzida pelos osteoblastos, que impede a ligação do RANKL ao RANK, inibindo assim a osteoclastogénese. De facto, a OPG funciona como um recetor solúvel com alta afinidade para o RANKL, competindo desta forma com o RANK pela ligação ao RANKL<sup>130</sup>. A OPG regula a densidade e a massa óssea nos animais e após administração sistémica, pode bloquear a reabsorção óssea patológica em vários modelos animais<sup>129</sup>.

A formação, maturação e regulação dos osteoclastos são, portanto, controladas pelo MCSF e pelo RANKL. Este último estimula a atividade osteoclástica e este efeito é regulado pela OPG, produzida pelos osteoblastos. A hormona paratiroidea (PTH) ativa os osteoclastos indiretamente através dos osteoblastos e a calcitonina é um potente inibidor direto da atividade osteoclástica, diminuindo a proliferação das células progenitoras e inibindo a diferenciação dos precursores. Fatores locais como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e o interferão gama (INF- $\gamma$ ) são também importantes reguladores da osteoclastogénese e atuam através de processos dependentes e independentes do RANKL e OPG. A reabsorção osteoclástica do osso liberta peptídeos colagénicos, fragmentos das ligações piridinolina e cálcio da matriz óssea através da produção, secreção e ação de enzimas lisossómicas, collagenases e catepsinas a um pH ácido<sup>131</sup>.



**Figura 5.** Esquema de reabsorção óssea  
(adaptado de Junqueira e Carneiro – *Histologia básica*)

### Remodelação óssea

O tecido ósseo encontra-se em permanente remodelação. Este processo é extremamente dinâmico e ocorre durante toda a vida. A remodelação óssea – reabsorção pelos osteoclastos e síntese de novo osso pelos osteoblastos, tem uma taxa de 30 a 100% por ano nas crianças e continua na idade adulta, apenas se torna mais lenta, cerca de 15% por ano no osso esponjoso e 5% por ano no osso compacto. Este processo assegura a homeostasia do cálcio e do fósforo e também a reparação de lesões ósseas. A remodelação óssea é o processo metabólico predominante na regulação da estrutura e função do osso durante a vida adulta e alterações neste processo podem resultar em perturbações graves da estrutura e função do esqueleto. A doença periodontal, por exemplo, pode levar a um desequilíbrio da remodelação, com excesso de atividade osteoclástica.

A reabsorção óssea e a formação óssea, ainda que atribuídas a células distintas, não são processos separados, regulados de forma independente. Os osteoblastos e os osteoclastos pertencem a uma única estrutura temporária, designada unidade básica multicelular (*Basic multicellular unit*– BMU)<sup>132</sup>. A BMU é constituída por um grupo de osteoclastos à frente, um grupo de osteoblastos na cauda, um vaso central, um nervo e tecido conjuntivo associado. Os componentes celulares da BMU têm uma inter-relação espacial e temporal bem definida e regulada.

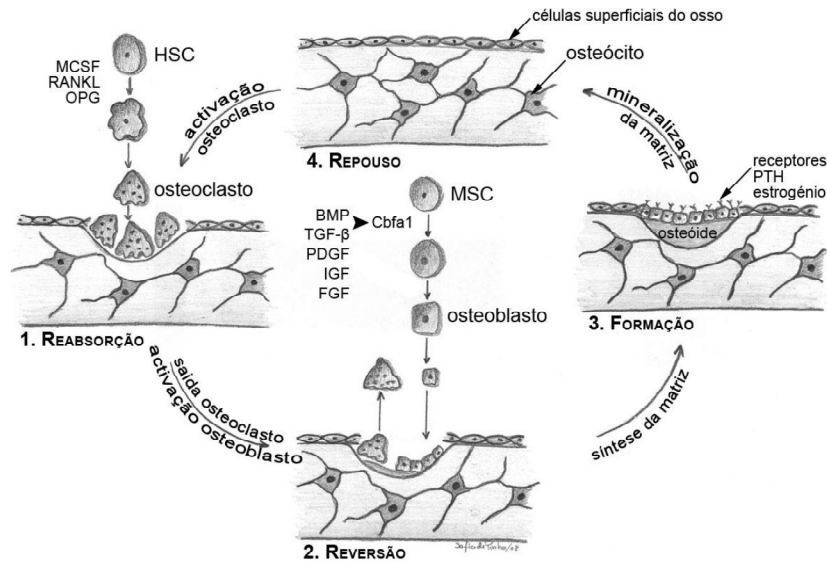
A reabsorção óssea é um processo constituído por várias etapas. Inicia-se com o recrutamento de precursores osteoclásticos imaturos, seguido da sua fusão e diferenciação em osteoclastos e, finalmente, da degradação do osso pelas células osteoclásticas maduras. O reconhecimento do osso pelos osteoclastos é controlado por integrinas, nomeadamente pela integrina  $\alpha_v\beta_3$  (recetor da vitronectina), importante para a ligação dos osteoclastos á superfície óssea<sup>133</sup>. Após a degradação do osso, da qual resulta a formação de uma lacuna de reabsorção, os osteoclastos destacam-se e são substituídos por osteoblastos.

Uma BMU dura cerca de 6-9 meses, muito mais do que cada uma das células que a constitui (osteoblastos - 3 meses; osteoclastos – 2 semanas), pelo que é essencial o recrutamento de novas células dos seus respetivos progenitores na medula óssea.

Como já foi referido, o desenvolvimento e diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos são controlados por fatores de crescimento e citocinas produzidas no microambiente da medula óssea, bem como por adesão de moléculas mediadoras das interações célula-célula e célula-matriz. Várias hormonas sistémicas e sinais mecânicos exercem também efeitos potentes sobre desenvolvimento e diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos.

As hormonas mais importantes no metabolismo ósseo são a paratormona, a 1,25-dihidroxitamina D, a calcitonina, os estrogéneos e os glicocorticóides. A hormona tiroidea e a vitamina D são bifásicas nas suas ações, aumentando a reabsorção óssea em concentrações altas (farmacológicas), mas auxiliando a formação óssea em concentrações baixas (fisiológicas). A calcitonina e o estrogénio inibem a reabsorção, enquanto os glicocorticóides inibem quer a formação quer a reabsorção óssea (mas primariamente a primeira). A ideia mais aceite é que as hormonas afetam primariamente o osso, alterando a secreção das citocinas antes mencionadas.

O mecanismo que regula esta remodelação ainda não é completamente compreendido. Uma questão fundamental é saber como é que os osteoclastos são ativados para atingir uma determinada localização. No entanto, à medida que os mesmos vão exercendo a sua função, vão-se formando as lacunas de reabsorção, que depois são preenchidas por células osteoblásticas. Os osteoblastos sintetizam os precursores moleculares da matriz óssea e regulam a sua mineralização. À medida que progride o processo de formação óssea, os osteoblastos preenchem as lacunas de reabsorção criadas pelos osteoclastos, produzindo osteóide. Os osteoblastos que ficam retidos na própria matriz passam a denominar-se osteócitos.



**Figura 6.** Esquema representativo da remodelação óssea

### Comunicação osteoblasto-osteoclasto

As funções dos osteoblastos e dos osteoclastos estão intimamente relacionadas. Durante o desenvolvimento do esqueleto e ao longo da vida, as células da linha osteoblástica sintetizam e segregam moléculas que por sua vez iniciam e controlam a diferenciação osteoclástica. Esta interação direta é crucial e foi já demonstrada<sup>134</sup>.

A remodelação óssea tem sido descrita como o “ciclo de remodelação óssea”, e inclui 4 fases: reabsorção, repouso, formação e reversão (Fig.6). No entanto, em termos de comunicações osteoblasto-osteoclasto, parece ser mais conveniente descrever a remodelação óssea em 3 fases: iniciação, transição e conclusão. A direção das comunicações é oposta nas fases de iniciação e transição: dos osteoblastos para os precursores dos osteoclastos na iniciação, e dos osteoclastos para os precursores dos osteoblastos (ou bidireccionalmente) na transição. A fase de iniciação inclui o recrutamento dos precursores osteoclásticos, diferenciação e ativação dos osteoclastos e manutenção da reabsorção óssea, que demora cerca de 3 semanas no osso humano. A fase de transição é o período em que a reabsorção óssea osteoclástica é inibida, os osteoclastos sofrem apoptose e os osteoblastos são recrutados e diferenciados. A fase de conclusão inclui a formação de novo osso, mineralização e repouso. Esta fase é mais longa porque a formação óssea, que demora cerca de 3 meses, é um processo muito mais lento do que a reabsorção. Na fase final, a diferenciação osteoclástica parece estar inibida



## Bibliografia

---

- <sup>1</sup>Sabeti MA et al. Healing of Apical Periodontitis after Endodontic Treatment with and without obturation in dogs. *J Endodon* 2006; 32: 628-33.
- <sup>2</sup>Tavares PBL et al. Prevalence of apical periodontitis in root canal treated teeth from an urban French population: influence of quality of root canal fillings and coronal restoration. *J Endodon* 2009; 35: 810-13.
- <sup>3</sup>Kirkvang LL et al. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in a Danish population. *Int Endod J* 2000; 33: 509-15.
- <sup>4</sup>Hommez GMG, Coppens CRM, De Moor RJG. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *Int Endod J* 2002; 35:680-9.
- <sup>5</sup>Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol* 1994;10: 105- 8.
- <sup>6</sup>Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28: 12-18.
- <sup>7</sup>Riccucci et al. Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000; 90: 354- 59.
- <sup>8</sup>Tronstad L et al. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 218- 21.
- <sup>9</sup>Kayahan MB et al. Periapical health related to the type of coronal restorations and quality of root canal fillings in a Turkish subpopulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2008; 105: e58-e62.
- <sup>10</sup>Segura-Egea JJ et al. Periapical status and quality of root canal fillings and coronal restorations in an adult Spanish population. *Int Endod J* 2004;37:525-30.
- <sup>11</sup>Siqueira JF Jr et al. Periapical status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100:369-74.
- <sup>12</sup>Chugal NM et al. Endodontic treatment outcome: effect of the permanent restoration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2007; 104: 576-82.
- <sup>13</sup>Ng YL et al. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J* 2008; 41: 6-31.
- <sup>14</sup>American Association of Endodontists. Obturation of root canal Systems. *Endodontics: Colleagues for Excellence* Fall 2009.
- <sup>15</sup>Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. Oxford: Blackwell, 1998.
- <sup>16</sup>Grossman L. *Endodontic Practic*. Philadelphia, Lea &Febiger 1981.
- <sup>17</sup>Harnden DG. Tests for carcinogenicity and mutagenicity. *Int Endod J* 1981;14:35.
- <sup>18</sup>Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in dentistry: a review of the mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc* 1981;103:429-34.
- <sup>19</sup>Grossman LI. A brief history of endodontics. *J Endod* 1982; 8: S36.

- 
- <sup>20</sup> Ingle JI et al. The obturation of radicular space. In: Ingle, Bakland and Baumgartner ed. Ingle's Endodontics 6<sup>th</sup> ed 2008; BC Becker Inc. 1053- 87.
- <sup>21</sup> Lohbauer U et al. Calcium release and pH characteristics of calcium hydroxide plus points. *Int Endod J* 2005; 38: 683-689.
- <sup>22</sup> Lui JN et al. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine impregnated gutta-percha points on *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37: 105-117.
- <sup>23</sup> Chogle S. et al. An in vitro assessment of iodoform gutta-percha. *J Endod* 2005; 31: 814-816.
- <sup>24</sup> Spångberg L, Langeland K. Biological effects of dental materials: 1 Toxicity of root filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg* 1973; 35:402-14.
- <sup>25</sup> Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endodon* 1975; 1: 395-402.
- <sup>26</sup> Szep S et al. In vitro cytotoxicity of medicated and nonmedicated gutta-percha points in cultures of gingival fibroblasts. *J Endodon* 2003; 29: 36-40.
- <sup>27</sup> Pascon EA, Sångberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *J Endodon* 1990; 16:429-33.
- <sup>28</sup> Siqueira Jr JF, Rôças IN and Lopes HP. Materiais obturadores. In: Gomes HP e Siqueira Jr JF eds. *Endodontia – Biologia e Técnica*. 2º ed. 2004; Editora Guanabara Koogan S.A.619-644.
- <sup>29</sup> Schwartz RS. Adhesive dentistry and endodontics. Part 2: bonding in root canal system – the promise and the problems: a review. *J Endodon* 2006; 12: 1125-134.
- <sup>30</sup> Tronstad L. Endodontic Instruments. In: Tronstad L ed. *Clinical Endodontics* 3<sup>th</sup>ed 2009; Thieme, 158-66.
- <sup>31</sup> Guigand M et al. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J Endodon* 1999; 25:419-23
- <sup>32</sup> Segura JJ, Jiménez-Rubio A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 72-74.
- <sup>33</sup> Markowitz K et al. Biological properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinical oriented review. *Oral Surg* 1992; 73: 729-37.
- <sup>34</sup> Araki K et al. Reduced citotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J Endodon* 1993; 19: 554-7.
- <sup>35</sup> Hashieh IA et al. Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol based sealers. *J Endodon* 1999; 25: 713-15.
- <sup>36</sup> Meryon SD, Johnson SG and Smith AJ. Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combinations. *J Dentist* 1988; 16: 66-70.
- <sup>37</sup> Chandrasekhar V et al. Expansion of gutta-percha in contact with various concentrations of zinc oxide-eugenol sealers: a three-dimensional volumetric study. *J Endodon* 2011; 37: 697-700.
- <sup>38</sup> Macchi RL et al. Influence of endodontic materials on the bonding of composite resin to dentin. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 26-9.
- <sup>39</sup> Sunzel et al. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leucocytes and human gingival fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 20-8.

- 
- <sup>40</sup>Leonardo MR et al. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 88: 221-25.
- <sup>41</sup>WHO Publications Centre, 1999. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Vol.71: reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Albany, NY.
- <sup>42</sup>Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials – histocompatibility, cytotoxicity and mutagenicity. *Clin Oral Invest* 1997; 1: 5-11.
- <sup>43</sup>Spangberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *J Endodon* 1993; 19: 596-98.
- <sup>44</sup>Serper A et al. Comparative neurotoxic effects of root canal filling materials on rat sciatic nerve. *J Endodon* 1998; 24: 592-94.
- <sup>45</sup>Erisen R, Yucel T, Kucukay S. Endomethasone root canal filling material in the mandibular canal: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 63: 343- 5.
- <sup>46</sup>Köseoğlu BG et al. Anesthesia following overfilling of a root canal sealer into the mandibular canal: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101: 803-6.
- <sup>47</sup>Oda K et al. Urticaria due to formaldehyde in a root canal dental-paste. *Skin Reseach* 2004; 3: 271- 74.
- <sup>48</sup>Braun JJ et al. Anaphylactic reactions to formaldehyde in root canal sealant after endodontic treatment: four cases of anaphylactic shock and three of generalized urticaria. *Allergy* 2003; 58: 1210-5.
- <sup>49</sup>Haïkel Y et al. Anaphylactic shock during endodontic treatment due to allergy to formaldehyde in a root canal sealant. *J Endodon* 2000; 26: 529-31.
- <sup>50</sup>Modre B and Kränke. Anaphylactic reaction to formaldehyde. *Allergy* 2001; 56: 263- 64.
- <sup>51</sup>Desai S and Chandler N. Calcium Hydroxide- based root canal sealers: a review. *J Endodon* 2009; 35: 475-80.
- <sup>52</sup>Tronstad L, Barnett F, Flax M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. *Endodontics and Dental Traumatology* 1988; 4: 152-9
- <sup>53</sup>Brystom A, Claesson R, Sundqvist G. The antimicrobial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 170- 5.
- <sup>54</sup>Manhart M. The calcium hydroxide method of endodontic sealing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54: 219- 24.
- <sup>55</sup>Stock C. Calcium hydroxide: root resorption and perio-endo lesions. *Br Dent J* 1985; 158: 325- 34.
- <sup>56</sup>Torneck C, Moe H and Howley T. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endodon* 1983; 9: 131- 6.
- <sup>57</sup>Tronstad I et al. pH changes in dental tissue after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endodon* 1981; 7: 17- 21.
- <sup>58</sup>Hauman CHJ and Love RM. Biocompatibility of dental material used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36: 75-85.
- <sup>59</sup>Stahle HJ et al. Effect of root canal filling materials containing calcium hydroxide on the alkalinity of root dentin. *Endodon and Dental Traumatol* 1995; 11: 163-8.
- <sup>60</sup>Soares et al. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealer. *J Endodon* 1990; 16: 166-9.

- 
- <sup>61</sup>Sleder FS et al. Long-term sealing ability of a calcium hydroxide sealer. *J Endodon* 1991; 17: 541- 43.
- <sup>62</sup>Ersev H et al. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells *in vitro*. *J Endodon* 1999; 25: 359-63.
- <sup>63</sup>Osorio RM et al. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endodon* 1998; 24: 91-6.
- <sup>64</sup>Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endodon J* 2011; 44: 697-730.
- <sup>65</sup>Ørstavik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics* 2005; 12: 25-38.
- <sup>66</sup>Cohen BI et al. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health* 1998; 88: 37- 39.
- <sup>67</sup>Eveil et al. Release of formaldehyde from endodontic sealers. *Asian J Chemis* 2009; 21: 2091- 98.
- <sup>68</sup>Pulgar R et al. The effect of AH 26 and AH Plus on MCF-7 breast cancer cell proliferation *in vitro*. *Int Endon J* 2002; 35: 551- 56.
- <sup>69</sup>Witworth JM, Boursin EM. Dissolution of root canal sealers cements in volatile solvents. *Int Endodon J* 2000; 33: 19- 24.
- <sup>70</sup>De Almeida WA et al. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endodon J* 2000; 33: 25- 7.
- <sup>71</sup>Schwant NW, Gound TG. Resorcinol-formaldehyde resin “Russian Red” endodontic therapy. *J Endodon* 2003; 29: 435-37.
- <sup>72</sup>Gambrel MG et al. The effect of endodontic solutions on Resorcinol-Formalin paste in teeth. *J Endodon* 2005; 31: 25-29.
- <sup>73</sup>Ho YC, Huang M and Chang YC. Cytotoxicity of formaldehyde on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2007; 83: 340- 44.
- <sup>74</sup>Tay FR et al. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. *J Endodon* 2005; 31: 659-64.
- <sup>75</sup>Shipper G et al. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). *J Endodon* 2004; 30: 342-47.
- <sup>76</sup>Heffernan ML et al. Clinical performance of Resilon and Gutta-Percha at 3 and 6 months. *J Endodon* 2004; 30: 342-47.
- <sup>77</sup>Kim YK et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endodon* 2010; 36: 383-99.
- <sup>78</sup>Brisenõ BM, Willerhausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. Silicone and resin based sealers. *J Endodon* 1991; 17: 537-40.
- <sup>79</sup>Huunonen S et al. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. *Int Endodon J* 2003; 36: 296-301.
- <sup>80</sup>Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealers materials. *Dent Mater* 2001; 17: 512- 519.
- <sup>81</sup>Wu D et al. The sealing ability of a new silicone-based root canal filling material (GuttaFlow): an *in vitro* study using the percentage of gutta-percha-filled area. *Dent Mat J* 2011; 30: 569- 75.

- 
- <sup>82</sup>Friedman S et al. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. *J Endodon* 1995; 21: 384- 90.
- <sup>83</sup>Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endodon J* 2003; 36: 660- 69.
- <sup>84</sup>Perez CR, Hirata R Jr, Sergio PP. Evaluation of antimicrobial activity of fluoride releasing dental materials using a new in vitro method. *Quintessence Int* 2003; 34: 473-7.
- <sup>85</sup>Coogan MM, Creeaven PJ. Antibacterial properties of eight dental cements. *Int Endodon J* 1993; 26: 355- 61.
- <sup>86</sup>Willershausen B et al. Cytotoxicity of root canal filling material to three different human cell lines. *J Endodon* 2000; 26: 703- 7.
- <sup>87</sup>Dahl J. E. Toxicity of endodontic filling materials. *Endodontics topics* 2005; 12:39-43.
- <sup>88</sup>Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium fosfate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gengiva and a mouse L929 cell line. *Int Endodon J* 2009; 42: 711-18.
- <sup>89</sup>Khashaba RM et al. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endodon J* 2011; 44: 342-52.
- <sup>90</sup>Zoufan K et al. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112: 657-61.
- <sup>91</sup>Chen CC et al. In vitro bioactivity and biocompatibility of dicalcium silicate cements for endodontic use. *J Endodon* 2009; 35: 1554- 57.
- <sup>92</sup>Bryan TE et al. In vitro osteogenic potencial of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endodon* 2010; 36: 1163- 69.
- <sup>93</sup>Collares FM et al. Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endodon J* 2012;45:63- 7.
- <sup>94</sup>Kuttler Y. Microscopic investigation of root apexes. *J Am Dent Assoc* 1955; 50: 544- 52.
- <sup>95</sup>Figueiredo JA et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endodon J* 2001; 34: 377-85.
- <sup>96</sup>Huang FM et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endodon J* 2002; 35: 153-8.
- <sup>97</sup> Kaplan AE et al. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endodon J* 2003; 36: 527-32.
- <sup>98</sup>Miletić I, et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J Endodon* 2005; 31: 307-9.
- <sup>99</sup>Williams DF. *Definitions in Biomaterials*. 1987. Oxford: Elsevier.
- <sup>100</sup>Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental-restorative material. *Clinical Oral Investigation* 1997; 1: 182-5.
- <sup>101</sup>Granchi D et al. Endodontic cements induce alterations in the cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodon* 1995; 79: 359-66.

- 
- <sup>102</sup>Pertot WJ et al. Model for quantitative immunohistochemical assessment of pulpar response to biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997; 15: 457-62.
- <sup>103</sup>Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary cultures. *J Endodon* 1989; 15:60-7.
- <sup>104</sup>Scmalz G. Use of cell cultures for cytotoxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dentistry* 1994; 22 (Suppl. 2): S6-11.
- <sup>105</sup>Tiozzo R et al. Study of the potential cytotoxicity of dental impression materials. *Toxicology in vitro* 2003; 17:657-62.
- <sup>106</sup>Al-Nazhan S, Spångberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endodon* 1990; 16: 129-34.
- <sup>107</sup>McNamara JR, Heithersay GS, WiebkinOW. Cell response to Hydron by a new in vitro method. *Int Endodon J* 1992; 25: 205-12.
- <sup>108</sup>Barbosa SV, Burkard DH, Spångberg LSW. Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. *J Endodon* 1994; 20: 6-8.
- <sup>109</sup>Beltes P et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endodon and Dent Traumatol* 1995; 11: 245-9.
- <sup>110</sup>Pelkonen O, Raunio H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Envir Health Perspect* 1997; 105(Suppl); 767- 74.
- <sup>111</sup>Heil J et al. Genotoxicity of dental materials. *Mutation Research* 1996; 368:181-94.
- <sup>112</sup>Brzovic V et al. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endodon J* 2009; 42: 253-63.
- <sup>113</sup>Proskuryakov SA, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of cell death? *Experim Cell Research* 2003; 1: 1-16.
- <sup>114</sup>Aslan JE, Ythomas G. Death committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. *Traffic* 2009; 10: 1390- 404.
- <sup>115</sup>Guimarães CA, Linden R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative death styles. *Europ J Biochem* 2004; 271: 1638-50.
- <sup>116</sup>Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endodon J* 2003; 36: 237- 45.
- <sup>117</sup>Cate RT. *Oral Histology – Development, struture and function. Chapter 7: Bone.*
- <sup>118</sup>Manolagas, SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21:115-37.
- <sup>119</sup>Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(3): 651-57.
- <sup>120</sup>Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.*2004; 34(3): 402-11.
- <sup>121</sup>Lehtonen-Veromaa M et al. A 1-year prospective study on the relationship between physical activity, markers of bone metabolism, and bone acquisition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(10): 3726-32.

- 
- <sup>122</sup>Ducy P, Schinke T, Karsenty. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289: 1501-4.
- <sup>123</sup>Thomas T, Lafage-Proust MH. Contribution of genetically modified mouse models to the elucidation of bone physiology. *Rev Rhum Engl* 1999; 66 (12): 728-35.
- <sup>124</sup>Lanyon, LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53 (sup.):102-7.
- <sup>125</sup>Smith AN, Jouret F, Bord S et al. Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(5): 1245-56.
- <sup>126</sup>Stenbeck G, Horton MA. Endocytic trafficking in actively resorbing osteoclasts. *J Cell Sci* 2004; 117(6): 827-36.
- <sup>127</sup>Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-8.
- <sup>128</sup>Karst M et al. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2004; 200(1): 99-106.
- <sup>129</sup>Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337- 42.
- <sup>130</sup>Lacey DL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2):165-76.
- <sup>131</sup>Baynes JW, Dominiczak MH. In: *Medical Biochemistry*. Capítulo 24, Elsevier Mosby 2<sup>a</sup> edição , 2005.
- <sup>132</sup>Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 273–86
- <sup>133</sup>Faccio R et al. Activation of alpha beta 3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(2): 522-5.
- <sup>134</sup>Tortelli F et al. Osteoblast and osteoclast differentiation in an in vitro three-dimensional model of bone. *Tissue Engenier* 2009;15: 2373-83.
- <sup>135</sup>Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Bioph* 2008; 473: 201- 9.





# **CAPÍTULO I**

**Osteoblastic cytocompatibility of endodontic sealers extracts prepared according to ISO standards and a root-dipping technique**



## 1. Introduction

Teeth with severe pulpar or periapical inflammation can be successfully treated with the established techniques of cleaning and shaping the root canals, followed by obturation of the root canal system. Most root canal filling techniques use core materials associated with endodontic sealers. For decades, gutta-percha has been considered the most adaptable and compatible core material. Gutta-percha has been evaluated in various cell culture systems and found to elicit no or low cytotoxicity<sup>1</sup>. The sealer serves as lubricant, fills the irregularities between the dentinal walls and the gutta-percha core, as well as the lateral or accessory canals, and bond both to gutta-percha and dentin<sup>1</sup>. Thereby, it is the sealer or its leachable compounds that comes into contact with the tissues of the root canal and pulp stump.

The contact of root canal filling materials and/or their eluents with the periapical tissues could damage the bone tissue, a process mediated partially by the osteoblasts, the primary cell type that forms bone in periradicular region. Thus, the acute and long-term response of osteoblasts to root canal sealers provides relevant information regarding the biocompatibility of these materials. Regarding this, several *in vitro* studies addressed the effect of endodontic sealers in different osteoblastic cell systems, namely in human U2-OS osteosarcoma cells<sup>2,3,4,5,6</sup>, human MG63 osteosarcoma cells<sup>7</sup>, rat cell lines MC3T3-E1 and ROS 17/2.8<sup>8,9,10,11</sup> and rat calvarial osteoblasts<sup>12</sup>, differing on the tested sealers and the exposure protocol. Most of them involved exposure of osteoblastic cells to sealers' extracts prepared according to ISO Standards 10993-5 (elution in the culture medium during 1 to 3 days, with a surface/medium ratio of 0.5 to 6.0 cm<sup>2</sup>/ml)<sup>13</sup>. *In vitro* studies performed with these extracts most probably overestimated the sealers' toxicity, considering that a 0.2 mm in diameter apex yields an area of ~0.03 mm<sup>2</sup>. Comparatively, the root-dipping technique, involving the dipping of a filled root in the culture medium to allow elution of the sealer into the medium through the apex of a natural tooth appears to better represent the classical clinical situation<sup>14,15,16</sup>.

Considering the relevance of the osteoblastic cytocompatibility of the endodontic sealers, the present study compared the cytotoxicity of different formulae-based sealers (GuttaFlow™, AH Plus™, Sealapex™, Tubliseal™ and RealSeal™) on MG63 osteoblastic cells, tested according to ISO Standards guidelines and the root-dipping technique.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Root canal sealers

Five sealers were tested:

- GuttaFlow™ (Roeko, Colténe/Whaledent) – silicone-based sealer with gutta-percha
- AH Plus™ (DentsplyDetrey) – epoxy resin-based sealer
- Sealapex™ (SybronEndo) – calcium hydroxide-based sealer
- Tubliseal™ (SybronEndo) – zinc oxide eugenol-based sealer
- RealSeal™ (SybronEndo) – methacrylate resin-based sealer

The composition of the sealers, as indicated by the manufacturers, is shown in Table 1.

GuttaFlow™	AH Plus™	Sealapex™
Gutta-percha powder	Paste A:	Active ingredients- Base:
Polydimethylsiloxane	Bisphenol-A epoxy resin	Calcium oxide
Silicone oil	Bisphenol-F epoxy resin	Zinc oxide
Paraffin oil	Calcium tungstate	Active ingredients- Catalyst:
Platinum catalyst	Zirconium oxide	Disalicylate resin
Zirconium dioxide	Silica	Trisalicylate resin
Nano-silver (preservative)	Iron oxide pigments	Isobutyl salicylate
Coloring	Paste B:	Mixed:
	Dibenzyl diamine	Calcium oxide (24%)
	Amino adamantane	Barium sulphate (20%)
	Tricyclodecane-diamine	Zinc oxide (7%)
	Zirconium oxide	Sub-micron silica (4%)
	Silica	Titanium dioxide (2%)
	Silicone oil	Zinc stearate (1%)
Tubliseal™	RealSeal™	
Active ingredients- Base:	Mixture of UDMA, PEGDMA, EBPADMA and BISGMA resins	
Zinc oxide	Silane-treated bariumborosilicate glasses *	
	*(contains a small amount of aluminium oxide barium sulfate)	
Active ingredients- Catalyst:	Silica	
Eugenol	Barium sulfate	
	Calcium hydroxide	
	Bismuth oxychloride with amines	
Mixed:	Peroxide	
Zinc oxide (59%)	Photo initiator	
Barium sulphate (4%)	Stabilizers	
Oleo resin (14%)	Pigments	
Thymol iodide (3%)		
Oil 8(%)		
Modifiers (2%)		
Eugenol (10%)		

**Table 1.** Composition of the tested root canal sealers.

## 2.2. Preparation of the sealers' extracts

### *ISO Standard technique*

The sealers were mixed according to the manufacturer's instructions under aseptic conditions. With an insulin syringe, 0.3 ml of each sealer was placed at the bottom of the well of a 24-well plate (Orange Scientific, Belgium) and the surface of the material was smoothed. Immediately after, 1.5 ml of culture medium was added to each well. The medium consisted of  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, UK), 10% foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. The plates were kept for 24h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/air. Following, culture medium was collected, diluted (1:2, 1:5, 1:10 and 1:20), aliquoted and frozen at -20°C.

### *Root-dipping technique*

Fifteen intact monoradicular teeth, freshly extracted, were used in this study. The crowns were removed at the cementodentinal junction with a diamond disk under water coolant. The root canals were prepared by the same operator at the cementodentinal junction with X-Smart device (Maillefer) using Protaper files, following the sequence: Sx, S1, S2; F1, F2 and F3. A 15 K-file was used between each protaper to verify the apex patency. The irrigant was 3% NaOCl delivered with a needle, 2 ml between each file size. The teeth were then sterilized at 135°C for 35 min. After sterilization, the teeth were randomly divided into 5 groups of 3 teeth and filled using the single cone obturation technique. Four groups were filled with gutta-percha cones corresponding to F3 protaper file (Maillefer), and the sealer, namely Sealapex, Tubliseal, AHPlus or GuttaFlow. The other group was filled with Resilon cones corresponding to F3 protaper file, using RealSeal as a sealer. This was performed under sterile conditions in a laminar flow hood. The apex of the roots was immediately dipped into 1.5 ml of culture medium for 24h. The extracts were then prepared as in ISO standard technique.

## 2.3. Exposure of osteoblastic cells to the sealers' extracts

Human MG63 osteoblastic cells were cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere) in  $\alpha$ -MEM containing 10% foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. At about 70-80%

confluence, cells were enzymatically detached (0.05% trypsin and 0.5 mM EDTA) and re-suspended in culture medium. The cell suspension was used for the cytocompatibility studies.

Cells were seeded ( $10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) into 96-well plates (Orange Scientific, Belgium), and cultures were incubated for 24h, for cell adhesion. Following, the culture medium was removed and replaced by one containing the sealers' extracts (pure extract and 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20 dilutions) obtained by the two techniques. Culture medium (containing the extracts) was replaced daily and cultures were characterized at days 1 and 3 for cell viability/proliferation.

In another set of experiments, cells were seeded at  $10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and, after the 24h adhesion period, cultures were exposed to the lowest concentration (1:20) of the sealers' extracts obtained by the two techniques, and maintained for 21 days. Culture medium (containing the extracts) was replaced once a week and cultures were characterized at days 7, 14 and 21 for cell viability/proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity.

In both experiments, pH of the culture medium was assessed at each time-point. Cultures performed in the absence of the extracts were used as control.

#### 2.4. Cell viability/proliferation

Cell viability/proliferation was evaluated by the reduction of the tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], (0.5 mg/ml), by viable cells, to form a purple formazan product, after 4h of incubation. The absorbance (A) was measured at 600 nm in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek), after crystals solubilisation in DMSO.

#### 2.5. ALP activity

Cell layers were solubilized (0.1% Triton X-100, 5 min), and ALP activity was evaluated in cell lysates by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate in alkaline buffer solution (pH~10.3; 30 min, 37 °C) and colorimetric determination of the product (*p*-nitrophenol) at 400 nm in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek). ALP activity was normalized to total protein content (quantified by Bradford's method) and expressed as nmol/min/mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup>.

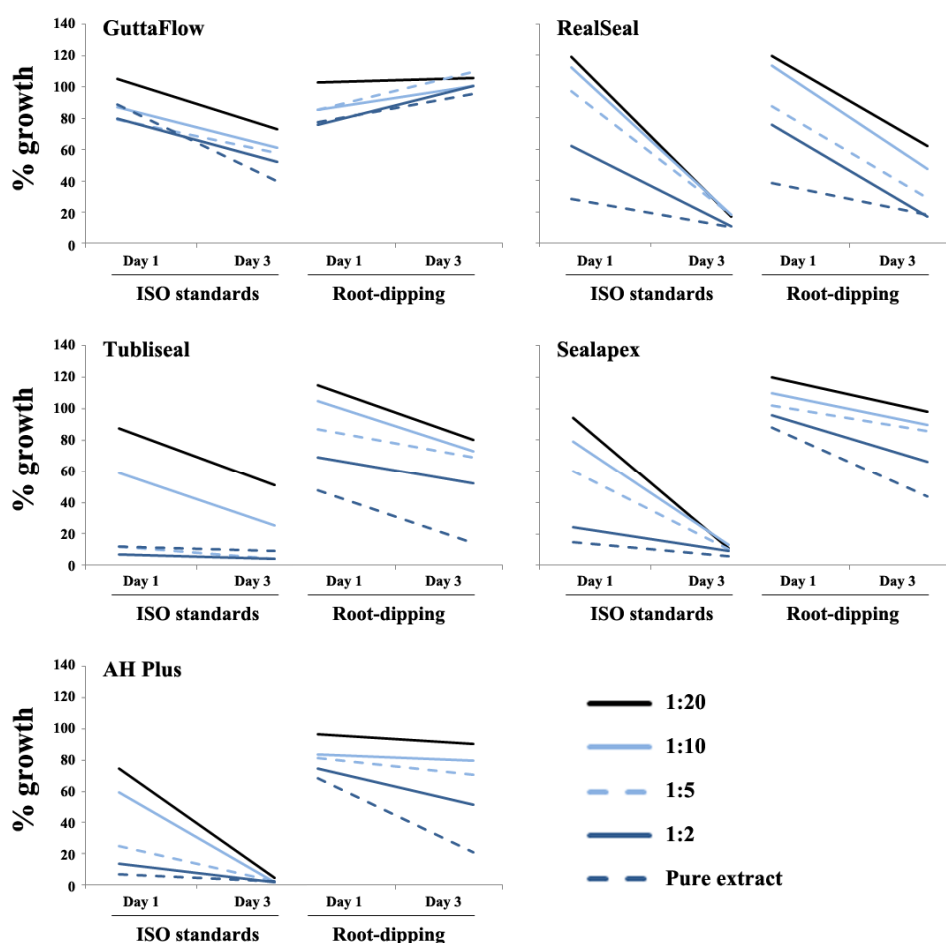
## 2.6. Statistical analysis

For statistical analysis, data were obtained from three separate experiments, each one performed in triplicate. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Groups of data were evaluated using a two-way analysis of variance (ANOVA). Statistical differences between controls and experimental conditions were assessed by Bonferroni's method. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant

## 3. Results

### 3.1. Acute dose-dependent effects

MG63 cells were exposed for 1 and 3 days to a concentration range of the sealers' extracts, and the percentage of cell growth is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Percentage of cell growth of MG63 osteoblastic cells cultured for 1 and 3 days and exposed to the sealers' extracts prepared according to ISO Standards 10993-5 and a root-dipping technique.

### *3.1.1. Extracts prepared according to ISO Standards.*

In the cultures exposed to GuttaFlow, cell growth was little affected at day 1 (~80%, at levels  $\geq 1:2$ ), but decreased significantly at day 3 (~73% to 40%). AH Plus and Sealapex caused a dose-dependent decrease on cell growth at day 1, and almost a total inhibition at day 3. RealSeal elicited a small stimulation on cell proliferation at day 1 in the presence of the lower concentrations (1:10 and 1:20, ~10 to 20%) and a dose-dependent decrease at higher levels; at day 3, cell growth was very low within the tested concentration range. In the presence of Tubliseal, toxicity also increased from day 1 to day 3, and at levels  $\geq 1:5$  the extract caused rapid cell death. The pH of the culture medium varied between 7.7 and 8.3 at day 1, except for the Sealapex extracts which presented a pH ~9.5. Afterwards, pH decreased rapidly and, at day 3, pH varied between 7.4 and 7.7, considering all the sealers.

### *3.1.2. Extracts prepared by the root-dipping technique.*

GuttaFlow caused an initial inhibition (~20% at day 1, levels  $\geq 1:2$ ) but, afterwards, the inhibitory effect decreased and, at day 3, values were similar to control. AH Plus caused a dose-dependent decrease in the cell growth, and the inhibition was similar at days 1 and 3, except in the presence of the pure extract (inhibition higher at day 3). Sealapex, Tubliseal and RealSeal elicited a slight increase in the cell growth at day 1, in the presence of the lower concentrations (~10 to 20%, at 1:10 and 1:20), and a dose-dependent decrease at higher levels; inhibition was higher at day 3, compared to day 1.

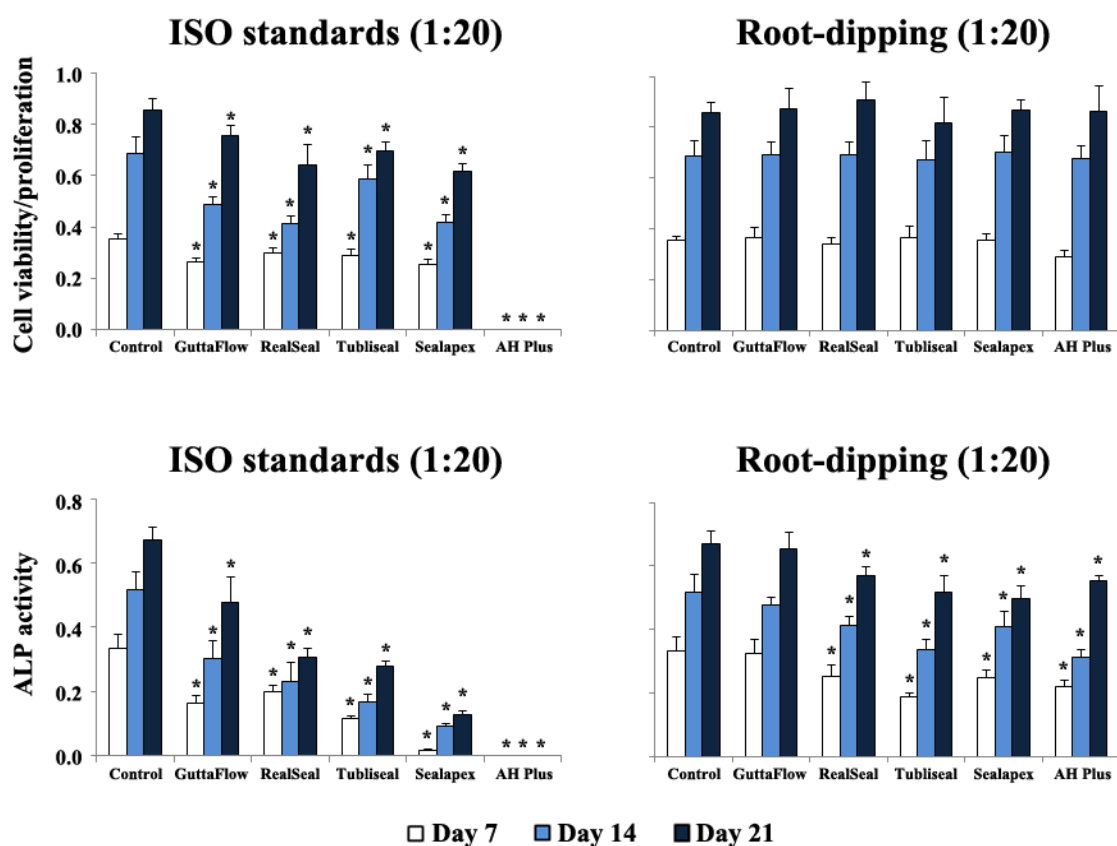
The pH of the culture medium remained around 7.4 during the 21-day culture time.

## *3.2. Long-term exposure to low levels of the sealers' extracts*

Osteoblastic cell cultures were exposed for 21 days to the lowest tested concentration (1:20) of the extracts, and were evaluated for cell viability/proliferation and ALP activity, Figure 2. The sealers' extracts prepared according to ISO Standards caused an inhibition of the cell growth. The inhibition was total with AH Plus and partial with the other sealers. At day 21, the percentages of inhibition were 12% (GuttaFlow), 18% (Tubliseal), 29% (Sealapex) and 25% (RealSeal). Regarding ALP activity, a similar



pattern was observed, but the inhibitory effect was higher. At day 21, the following percentages of inhibition were observed: 28% (GuttaFlow), 58% (Tubliseal), 71% (Sealapex) and 54% (RealSeal). The extract prepared by the root-dipping technique did not affect cell growth during the culture period. However, a partial inhibitory effect was observed in ALP activity, except with GuttaFlow. At day 21, the percentages of inhibition were 17% (AH Plus), 22% (Tubliseal), 25% (Sealapex) and 15% (RealSeal).



**Figure 2.** Cell viability/proliferation and ALP activity of MG63 osteoblastic cells cultured for 21 days and exposed to the lowest concentration of the sealers' extracts (1:20 dilution) prepared according to ISO Standards 10993-5 and a root-dipping technique. \*Significantly different from control (absence of the extracts).

#### 4. Discussion

The contact of endodontic sealers and/or their leachable compounds with the periapical tissues might cause deleterious effects in the local bone metabolism, and several *in vitro* studies suggest that osteoblastic cells are a relevant target cell type for these effects<sup>1</sup>. This work compared the behaviour of MG63 osteoblastic cells in the presence of the sealers' extracts prepared according to ISO Standards 10993-5 and by the root-dipping technique<sup>14,15,16</sup>. The two methodologies provide distinct information regarding the biological profile of endodontic sealers, as the extracts are obtained using a different surface area/volume of culture medium. The extracts were prepared by incubating the freshly mixed sealers with culture medium as, clinically, the sealer is applied after mixing and the unset material/leachable compounds might contact immediately with the local tissues.

During the first days after the sealer' application, the local concentration of the degradation products/leachable compounds is expected to be high, due to the favorable concentration gradient. However, levels of these compounds decrease progressively due to the continuous fluid flow and clearance, and, after a variable time-period, their concentration is expected to be very low<sup>1</sup>. This is a relevant issue, as the endodontic sealers remain in the local of application for many years. Thus, the characterization of the cell response in the presence of low levels of the sealers' degradation products/leachable compounds for long periods might provide useful information in predicting the long-term clinical performance of these materials. Considering this, two set of experiments were performed. In the first one, osteoblastic cells were exposed to high concentrations of the extracts, for 1 and 3 days, aiming to compare the dose-dependent acute cell response to the extracts obtained by the two methodologies. Following, the osteoblastic cell response was evaluated in cultures exposed for 21 days to the lowest concentration of the extracts obtained by the two techniques.

Regarding the acute cell response, the sealers' extracts, prepared according to ISO Standards or by the root-dipping technique, caused significant cytotoxic effects. GuttaFlow exhibited the lowest toxicity compared to the other sealers. Evident dose-dependent inhibitory effects on cell viability/proliferation were observed at day 1 for most of the sealers. The small stimulatory effect seen with low concentrations of RealSeal (ISO 10993-5) or Sealapex, Tubliseal and RealSeal (root-dipping technique) reflects most probably an adaptive response to the presence of toxic compounds.

Cytotoxicity was time-dependent, as the inhibition was higher at day 3, compared to that on day 1. These results suggest that the continuous exposure to the sealers leachable compounds caused cumulative toxic effects. The only exception was the extract from GuttaFlow prepared by the root-dipping technique. In this case, cells were able to recover from the initial deleterious effects and, at day 3, cell response was similar to control.

In the long-term cell response to the lowest concentration of the two extracts, significant differences were noticed. Cell viability/proliferation and, to a more extent, ALP activity were significantly decreased in the cultures exposed to the extract prepared according to ISO Standards. The extract prepared by the root-dipping technique did not affect cell viability/proliferation, but decreased partially ALP activity. Thus, synthesis of ALP was more sensitive to the deleterious effects of the sealers' extracts than cell viability/proliferation. This is a relevant issue, as ALP is an early marker of osteogenic differentiation, and has a determinant role in the bone tissue, by providing phosphate ions that, with calcium ions, are used in the formation of the cell-mediated calcium phosphate mineralized matrix<sup>17</sup>.

In spite of the similarities in the pattern of the cell response to the two types of extracts, those prepared according to ISO 10993-5 caused significantly higher quantitative cytotoxic effects. This behaviour is expected considering that the ratio surface area/volume of culture medium was  $\sim 2 \text{ cm}^2/1.5 \text{ ml}$  and  $\sim 0.03 \text{ mm}^2/1.5 \text{ ml}$ , respectively in the ISO 10993-5 and the root-dipping technique and, thus, the percentage of the leachable compounds in the extract is expected to be significantly different in the two extracts.

Few studies were performed in osteoblastic cells involving the sealers tested in the present work. AH Plus, an epoxy resin-based sealer apparently "formaldehyde-free", appeared to be cytotoxic for human U2-OS osteosarcoma cells<sup>2,3</sup>. Another study, performed in the osteoblast rat cell lines MC3T3-E1 and ROS 17/2.8, showed that the toxicity of AH Plus decreased with the aging of the sealer<sup>11</sup> and that these cell lines responded differently to this sealer<sup>10</sup>. It was also shown that this sealer exhibits a moderate to severe toxicity immediately after mixing (the conditions used in the present work) in fibroblasts<sup>10,18,19,20,21,22,23,24,25</sup> and human periodontal ligament cells<sup>26</sup>. It has been associated to the release of low levels of formaldehyde, the presence of amines added to accelerate the epoxy polymerization and the epoxy resin content<sup>20,27</sup>. Extracts of Sealapex, a calcium hydroxide based sealer, were toxic to rat calvarial osteoblasts<sup>12</sup>

and MC3T3-E1 osteoblast cells<sup>8</sup>, and also to fibroblasts<sup>23,28</sup> and human periodontal ligament cells<sup>26,29</sup>; its toxicity might involve the increase in the pH of the culture medium resulting from the sealer dissolution<sup>20,30,31</sup>. In the present work, a partial contribution of this effect might be hypothesized to explain the deleterious effect observed with the extracts prepared according to ISO Standards. However, the pH remained constant throughout the culture time in the extracts obtained by the root-dipping technique, thus other components are involved in the observed cytotoxicity, and polyresin, zinc oxide and Ba<sup>2+</sup> have also been suggested as potential toxic compounds<sup>31</sup>. Realseal was also evaluated in osteoblast cells. Disks of RealSeal, after setting, were placed in direct contact with ROS 17/2.8 cells for 5 succeeding weeks after immersion in simulated body fluid, and results showed that toxicity decreased gradually over time<sup>9</sup>. In another study, RealSeal extracts showed initial cytotoxicity effect on MG63 cells which disappeared after few days of culture<sup>7</sup>. In addition, this sealer was shown to be rather toxic in fibroblasts<sup>10,16,18,19,21,28,32,33,34</sup> and human dental pulp cells<sup>34</sup>. Toxicity of this dual-cured hydrophilic multi-methacrylate resin-based sealer appears to be caused by the leaching of unreacted monomers as a result of incomplete polymerization, and also to filler particles due to the degradation of the sealer. The toxicity of Tubliseal, a zinc oxide eugenol-based sealer, was demonstrated in fibroblasts<sup>24</sup> and human periodontal ligament cells<sup>29</sup>, and has been attributed to free eugenol release, and also several additives, namely resins used for greater dentin adhesion<sup>31</sup>. The low cytotoxicity of GuttaFlow observed in the present work is in line with studies involving fibroblasts<sup>18,19,24,25,33</sup>. This is a silicone-based sealer manufactured by adding gutta-percha powder to the silicone matrix (and containing nanosilver particles as a preservative). Toxicity might result from the release of nanosilver particles, as they have been associated with dose-dependent cytotoxic effects<sup>31</sup>. Also, the presence of small voids within the core of GuttaFlow favors the release of unreacted compounds that accumulates in such pores<sup>35</sup>.

The studies referenced above differed in the target cell type, preparation of the extracts, tested concentrations and time of exposure, which is reflected by a great results discrepancy on cytotoxicity patterns or the effects on a specific cell type. Most of them involved fibroblastic cells, short exposures and high levels of the sealers extracts. Nevertheless, the results of the present work are in line with the reported studies, which showed mostly *in vitro* cytotoxicity of the endodontic sealers. However, to the best of our knowledge, this is the first study to compare the acute and long-term osteoblastic

cell response to extracts prepared according to ISO Standards and the root-dipping technique. Both methodologies provide useful information that might be representative of distinct clinical settings, respectively situations associated with overfilling conditions, with the local tissues contacting with high levels of leachable compounds, and to the current filling, in which local levels of these compounds are significantly lower. However, it should be stressed that cytotoxicity *in vivo* is expected to be greatly attenuated due to the continuous local clearance, the presence of the extracellular matrix and the three-dimensional tissue structure. Also, with the progressive completion of curing and elution, decreased cytotoxicity is predictable.

## **5. Conclusion**

Extracts from GuttaFlow™, AH Plus™, Sealapex™, Tubliseal™ and RealSeal™, prepared according to ISO Standards 10993-5 and a root-dipping technique caused mostly acute dose- and time-dependent inhibitory effects in the cell viability/proliferation of MG63 osteoblastic cells. Results for the long-term exposure to the lowest tested concentration of the two types of extracts showed that the extract prepared according to ISO Standards caused a significant inhibition in the cell viability/proliferation and ALP activity, whereas the extract from the root-dipping technique did not affect cell growth but inhibited partially ALP activity. The ISO Standards extract caused significantly higher acute and long-term cytotoxicity, but both methodologies provide useful information regarding the cytotoxicity of endodontic sealers. In addition, the long-term exposure to low concentrations of the sealers' degradation products and leachable compounds might affect the functional activity of osteoblastic cells, with the possibility of deleterious effects in the local bone metabolism.

## References

---

- <sup>1</sup>Dahl JE. Toxicity of endodontic filling materials. *Endodontic topics* 2005; 12:39-43.
- <sup>2</sup>Huang FM, Chou MY and Chang YC. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression by epoxy resin and zinc oxide-eugenol based root canal sealers in human osteoblastic cells. *Biomater* 2003; 24: 1869-75.
- <sup>3</sup>Huang FM et al. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endodon* 2005; 31: 679-83.
- <sup>4</sup>Huang FM, Yang S-F and Chang Y-C. Up-regulation of gelatinases and tissue type plasminogen activator by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endodon* 2008; 34: 291-4.
- <sup>5</sup>Huang FM et al. Up-regulation of receptor activator nuclear factor-kappa B ligand expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endodon* 2009; 35: 363-6.
- <sup>6</sup>Huang FM, Yang S-F and Chang Y-C. Effects of root canal sealers on alkaline phosphatase in human osteoblastic cells. *J Endodon* 2010; 36: 1230-3.
- <sup>7</sup>Xu P et al. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast like MG63 cells. *J Endodon* 2010;36: 40- 4.
- <sup>8</sup>Lee DH et al. Mechanisms of root canal sealers cytotoxicity on osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodon* 2007;104: 717- 21.
- <sup>9</sup>Ames JM et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endodon* 2009; 35: 225- 8.
- <sup>10</sup>Brackett MG et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Research B: Applied Biomaterials* 2010; 95B: 380- 6.
- <sup>11</sup>Bryan TE et al. In vitro osteogenic potential of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endodon* 2010, 36: 1163-9.
- <sup>12</sup>Al-Awadhi S et al. Cultured primary osteoblasts viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endodon* 2004;30: 527- 33.
- <sup>13</sup>ISO standards 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- <sup>14</sup>Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endodon* 2003; 29: 583-6.
- <sup>15</sup>Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endodon* 2002; 28: 749-53.
- <sup>16</sup>Susini G et al. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endodon J* 2006; 39: 940-4.
- <sup>17</sup>Aubin J. "Mesenchymal stem cell and osteoblast differentiation", in *Principles of bone biology*, eds. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, Academic Press 2008; 85-107.
- <sup>18</sup>Bouillaguet S et al. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endodon* 2006; 32: 989-92.
- <sup>19</sup>Brackett MG et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endodon J* 2008; 41: 1072-8.
- <sup>20</sup>Eldeniz AU et al. Evaluation of pH and ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodon* 2007;103(3): e86- e91.

- 
- <sup>21</sup>Lodienè G et al. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endodon J* 2008; 41: 72-7.
- <sup>22</sup>Miletić I et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus Compared during different setting periods. *J Endodon* 2005; 31: 307-9.
- <sup>23</sup>Silva EJ et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endodon J* 2012; 45: 49-56.
- <sup>24</sup>Zoufan K et al. Cytotoxicity evaluation of GuttaFlow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodon* 2011;112: 657-61.
- <sup>25</sup>Willershausen I et al. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & Face Medicine* 2011; 7: 15-23.
- <sup>26</sup>Huang FM et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endodon J* 2002; 35: 153- 8.
- <sup>27</sup>Merdad K et al. Short term cytotoxicity assessment of components of the Epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct Millipore filter assays. *J Endodon* 2007;33: 24- 7.
- <sup>28</sup>Key JE, Raheemulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endodon* 2006; 32: 756-8.
- <sup>29</sup>Chang MC et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblast. *Int Endodon J* 2010; 43: 251-7.
- <sup>30</sup>Duarte MA et al. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *J Endodon* 2000; 26: 389-90.
- <sup>31</sup>Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root canal filling materials. *Int Endodon J* 2003; 36: 147-60.
- <sup>32</sup>Donadio M et al. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodon* 2009; 107: e74- e78.
- <sup>33</sup>Eldeniz AU et al. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide-, and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingival and L929 cell lines. *Int Endodon J* 2007; 40: 329-37.
- <sup>34</sup>Karapinar-Kazandağ M et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endodon J* 2011; 44: 626- 34.
- <sup>35</sup>Elayouti A et al. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endodon* 2005; 31: 687-90.





## **CAPÍTULO II**

**Long-term dose and time-dependent cytotoxicity profile of endodontic sealers in human *in vitro* osteoclastogenesis**



## 1. Introduction

The root canal sealer, by interrupting the connection between periapical tissues and the oral cavity, could allow the normal healing at the periapical level and the biologic sealing with the formation of osteocement. On this account and beyond the characteristics of adhesion, volume, stability, insolubility and antibacterial action, a cement must also be well tolerated in case it reaches the periapical tissues, and it must not interfere with the periodontal healing process. Sometimes, the persistence of an apex reaction can be noted even after proper root canal treatment. This reaction could be related to the use of root canal sealers that release substances toxic to the bone cells, which are directly involved in the healing process.

Bone remodelling requires the coordinated regulation of osteoblast and osteoclast activity<sup>1</sup>. This is why the *in vitro* evaluations of materials that contact with bone, as the endodontic sealers, should involve the analysis of osteoblast proliferation and differentiation but also the differentiation and activity of osteoclastic cells. In this context, few studies address the cytotoxicity of endodontic materials in osteoblastic cells<sup>2,3,4</sup>. There are also *in vivo* studies that analyse bone formation following the intraosseous implantation of endodontic filling material<sup>5,6</sup>. However, assessment of the effect of these materials on osteoclastic cells, up to our knowledge, has not been published.

Osteoclasts are multinucleated cells that derive from hematopoietic progenitors found in the bone marrow<sup>7</sup> and in circulation in peripheral blood<sup>8</sup>. They promote bone resorption through the secretion of acid and lytic enzymes, which initiate the remodelling process<sup>1,7,9</sup>. Osteoclastogenesis is a complex process that requires both a network of cellular interactions and paracrine mechanisms<sup>10,11</sup>. Regarding this, there are two factors that are key players in the process, and are sufficient to promote osteoclastogenesis *in vitro*, namely, the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and the receptor for activation of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)<sup>12</sup>.

This study evaluates the concentration and time-dependent effects of several endodontic sealers (AH Plus<sup>TM</sup>, GuttaFlow<sup>TM</sup>, Tubliseal<sup>TM</sup>, Sealapex<sup>TM</sup> and RealSeal<sup>TM</sup>) in the differentiation and function of osteoclast precursors, present on human peripheral blood mononuclear cells. The effect of the sealers was evaluated in unstimulated (absence of exogenous osteoclastogenic stimuli) and also in stimulated (presence of recombinant M-CSF and RANKL) osteoclast precursors. Cell cultures were assessed for

osteoclastic markers, and the involvement of several osteoclastogenic-related signalling pathways.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Root canal sealers

In this study, five sealers were tested:

- GuttaFlow (Roeko, Coltène/Whaledent) – silicone-based sealer with gutta-percha
- AH Plus (DentsplyDetrey) – epoxy resin-based sealer
- Sealapex (SybronEndo,) – calcium hydroxide-based sealer
- Tubliseal (SybronEndo) – zinc oxide eugenol-based sealer
- RealSeal (SybronEndo) – methacrylate resin-based sealer

The composition of the sealers, as indicated by the manufacturer, is shown in Table 1.

<b>GuttaFlow™</b>	<b>AH Plus™</b>	<b>Sealapex™</b>
Gutta-percha powder	Paste A:	Active ingredients- Base:
Polydimethylsiloxane	Bisphenol-A epoxy resin	Calcium oxide
Silicone oil	Bisphenol-F epoxy resin	Zinc oxide
Paraffin oil	Calcium tungstate	Active ingredients- Catalyst:
Platinum catalyst	Zirconium oxide	Disalicylate resin
Zirconium dioxide	Silica	Trisalicylate resin
Nano-silver (preservative)	Iron oxide pigments	Isobutyl salicylate
Coloring	Paste B:	Mixed:
	Dibenzyl diamine	Calcium oxide (24%)
	Aminoadamantane	Barium sulphate (20%)
	Tricyclodecane-diamine	Zinc oxide (7%)
	Zirconium oxide	Sub-micron silica (4%)
	Silica	Titanium dioxide (2%)
	Silicone oil	Zinc stearate (1%)
<b>Tubliseal™</b>	<b>RealSeal™</b>	
Active ingredients- Base:	Mixture of UDMA, PEGDMA, EBPADMA and BISGMA resins	
Zinc oxide	Silane-treated bariumborosilicate glasses *	
	*(contains a small amount of aluminium oxide barium sulfate)	
Active ingredients- Catalyst:	Silica	
Eugenol	Barium sulfate	
	Calcium hidroxide	
	Bismuth oxychloride with amines	
Mixed:	Peroxide	
Zinc oxide (59%)	Photo initiator	
Barium sulphate (4%)	Stabilizers	
Oleo resin (14%)	Pigments	
Thymol iodide (3%)		
Oil 8(%)		
Modifiers (2%)		
Eugenol (10%)		

**Table 1.** Composition of the tested root canal sealers.

## 2.2. Preparation of the sealers' extracts

The sealers' extracts were prepared according to ISO Standards 10993-5 (for cytotoxicity testing, the dental material should be stored for 1 to 3 days in the extraction vehicle and the surface/medium rate should be 0.5 to 6.0cm<sup>2</sup>/ml).

The sealers were mixed according to the manufacturer's instructions under aseptic conditions. With an insulin syringe, 0.3ml of each sealer was placed at the bottom of the well of a 24-well plate (2 cm<sup>2</sup>) (Orange Scientific, Belgium) and the surface of the material was smoothed. Immediately after, 1.5 ml of culture medium was added to each well. The medium had the following composition: Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM – Gibco, UK) supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. The plates were kept for 24h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/air. Following, culture medium was removed, diluted (1:20, 1:100, 1:500 and 1:2500), aliquoted and frozen at -20°C. At this concentration range, the pH of the culture medium remained constant (pH = 7.4).

## 2.3. Osteoclastic cell cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood of healthy male donors with 25 to 35 years old, as described previously<sup>13,14</sup>. Briefly, after dilution 1:2 with PBS (137 mMNaCl, 10 mM phosphate, 2.7 mMKCl, pH 7.4), blood was applied on top of Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences, USA) and centrifuged at 400g for 30 min. PBMC were collected from the interface Ficoll-Paque with PBS and washed twice with PBS. On average, for each 100 ml of processed blood about 70x10<sup>6</sup> PBMC were obtained.

PBMC were seeded in 96-well plates at a density of 1.5x10<sup>6</sup>cells/cm<sup>2</sup>, based in previous studies<sup>11,15</sup>. Cells were cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 30% human serum (from the same donor from which cells were obtained), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B, and were incubated for 24h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. After overnight attachment, cultures were exposed to a concentration range of the sealers' extracts (1:20, 1:100, 1:500 and 1:2500) in 2 experimental conditions: absence (base medium) or presence

(M+R) of recombinant M-CSF, 25 ng/ml, (R&DSYSTEMS, Minneapolis, USA) and RANKL, 40 ng/ml, (InsightBiotechnology, Wembley, UK)<sup>15</sup>. Cultures were maintained for 21 days in the conditions described above. Culture medium was replaced once a week and the extracts were renewed in each medium change. Cultures performed in the absence of the extracts were used as control.

Cultures were characterized at days 7, 14 and 21 for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and number of TRAP-positive multinucleated cells. In addition, for each sealer, cultures exposed to the lowest tested concentration of the extract that caused statistically significant differences (stimulatory or inhibitory) on these parameters were further analysed for the presence of actin rings, vitronectin and calcitonin receptors, RT-PCR for the expression of osteoclast-related genes and calcium phosphate resorbing ability; the involvement of some intracellular mechanisms in the cell response to the extracts was also addressed. The selected concentrations were 1:2500 for AH Plus (which caused a stimulatory effect at day 21) and 1:500 for the other sealers (which caused an inhibitory effect).

#### *2.4. Characterization of the osteoclastogenic response*

*TRAP activity and total protein content.* TRAP activity was determined by the p-nitrophenylphosphate (pNPP) hydrolysis assay, at days 7, 14 and 21, as described before<sup>16</sup>. Shortly, cell layers were washed twice with PBS and solubilized with 0.1% (v/v) Triton X-100. After that, cellular extracts were incubated with 12.5mMpNPP in 12.5 mM tartaric acid (0.04M) and 0.09M citrate (pH 4.8) for 1 h at 37°C. The reaction was stopped with 5M NaOH, and the absorbance of the samples at 400nm was measured in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek). TRAP activity was normalized to total protein content, and was expressed as  $\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$ .

Total protein content of cell cultures was quantified at days 7, 14, and 21 by Bradford's method<sup>17</sup>, using bovine serum albumin as a standard. After being washed twice with PBS, cell cultures were solubilized in 0.1M NaOH, and were treated with Coomassie1 Protein Assay Reagent (Fluka) for 2 min at room temperature. The 595nm absorbance was determined in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek).

*TRAP-positive multinucleated cells.* At days 14 and 21, PBMC cultures were washed twice with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min, rinsed with distilled water,

and stained for TRAP with acid phosphatase, leukocyte (TRAP) kit (Sigma), according manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated with naphthol AS-BI 0.12 mg/ml in the presence of 6.76mM tartarate and 0.14 mg/ml Fast Garnet GBC at 37°C for 1 h in the dark. After incubation, cell layers were washed and stained with hematoxylin. TRAP-positive (purple/dark red) and multinucleated (>2 nuclei) cells were counted with Nikon TMS microscope (Nikon Instruments Inc, USA).

*Visualization of actin rings and vitronectin and calcitonin receptors by confocal laser scanning microscopy (CLSM).* After being washed twice with PBS, 21 days cultures were fixed with 3.7% (v/v) p-formaldehyde for 15 min. After that, they were permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X 100 for 5 min and stained for actin with 5 U/ml Alexa Fluor® 647-Phalloidin (Invitrogen), for vitronectin receptor (VNR) and calcitonin receptor (CTR) with 50 µg/ml mouse IgGs anti-VNR and IgGs anti-CTR (R&D Systems), respectively. Anti-VNR and anti-CTR detection was performed with 2 µg/ml Alexa Fluor® 488-Goat anti-mouse IgGs.

*Osteoclast gene expression by RT-PCR analysis.* Cultures with 21 days were analyzed for RT-PCR for the expression of the housekeeping gene glycerol-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the osteoclast-associated differentiation and activation factors c-myc and c-src, respectively<sup>18</sup>, and the osteoclast functional genes TRAP, cathepsin K (CATK), and carbonic anhydrase 2 (CA2). RNA was extracted with Rneasy® Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions and was quantified by UV spectrophotometry at 260 nm. For that, 0.5 µg of RNA was reverse transcribed and amplified (25 cycles) with the Titan One Tube RT-PCR System (Roche), with an annealing temperature of 55°C. The primers used are listed on Table 2. RT-PCR products were electrophoretically separated on a 1%(w/v) agarose gel and subjected to densitometric analysis with ImageJ 1.41 software. Values were normalized to the corresponding GAPDH value of each experimental condition.

Gene	5' Primer	3' Primer
GAPDH	5'-CAGGACCAGGTTACCAACAAGT-3'	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACTGT-3'
TRAP	5'-ACCATGACCACCTTGCAATGTCTC-3'	5'-ATAGTGGAAGCGCAGATAGCCGTT-3'
CATK	5'-AGGTTCTGCTGCTACCTGTGGTGAG-3'	5'-CTTGCATCAATGGCCACAGAGACAG-3'
CA2	5'-GGACCTGAGCACTGGCATAAGGACT-3'	5'-AAGGAGGCCACGAGGATCGAAGTT-3'
c-myc	5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3'	5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTG-3'
c-src	5'-AAGCTGTTCGGAGGCTTCAA-3'	5'-TTGGAGTAGTAGGCCACCAG-3'

**Table 2.** Primers used on RT-PCR analysis of PBMC cultures.

*Calcium phosphate resorption activity.* After 21 days of culture on BDBioCoat™Osteologic™ Bone Cell Culture Plates (BD Biosciences), PBMC cultures were bleached with 6% NaOCl and 5.2% NaCl, according to manufacturer's instructions. Calcium phosphate layers were visualized by phase contrast light microscopy. Image analysis of the resorbed areas was performed with ImageJ 1.41 software.

### 2.5. Osteoclastogenic signaling pathways

PBMC cultures were characterized for the involvement of several signalling pathways in, namely, MEK, NFkB, PKC, JNK, p38, MAPKK pathways and PGE2 production<sup>16,18,19</sup>. For that, cell cultures were performed in the presence of the corresponding signalling pathway inhibitors (Table 3), and were assessed for TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells, at days 14 and 21.

Molecule	Inhibited pathway	Concentration
<i>U0126</i>	MEK	1 µM
<i>PDTC</i>	NFkB	10 µM
<i>GO6983</i>	PKC	5 µM
<i>SP600125</i>	JNK	10 µM
<i>SB202190</i>	p38	5 µM
<i>PD98,059</i>	MAPKK	10 µM
<i>Indomethacin</i>	PGE2 synthesis	1 µM

**Table 3.** Tested inhibitors of osteoclastogenic-related intracellular signalling pathways.



## 2.6. *Statistical analysis*

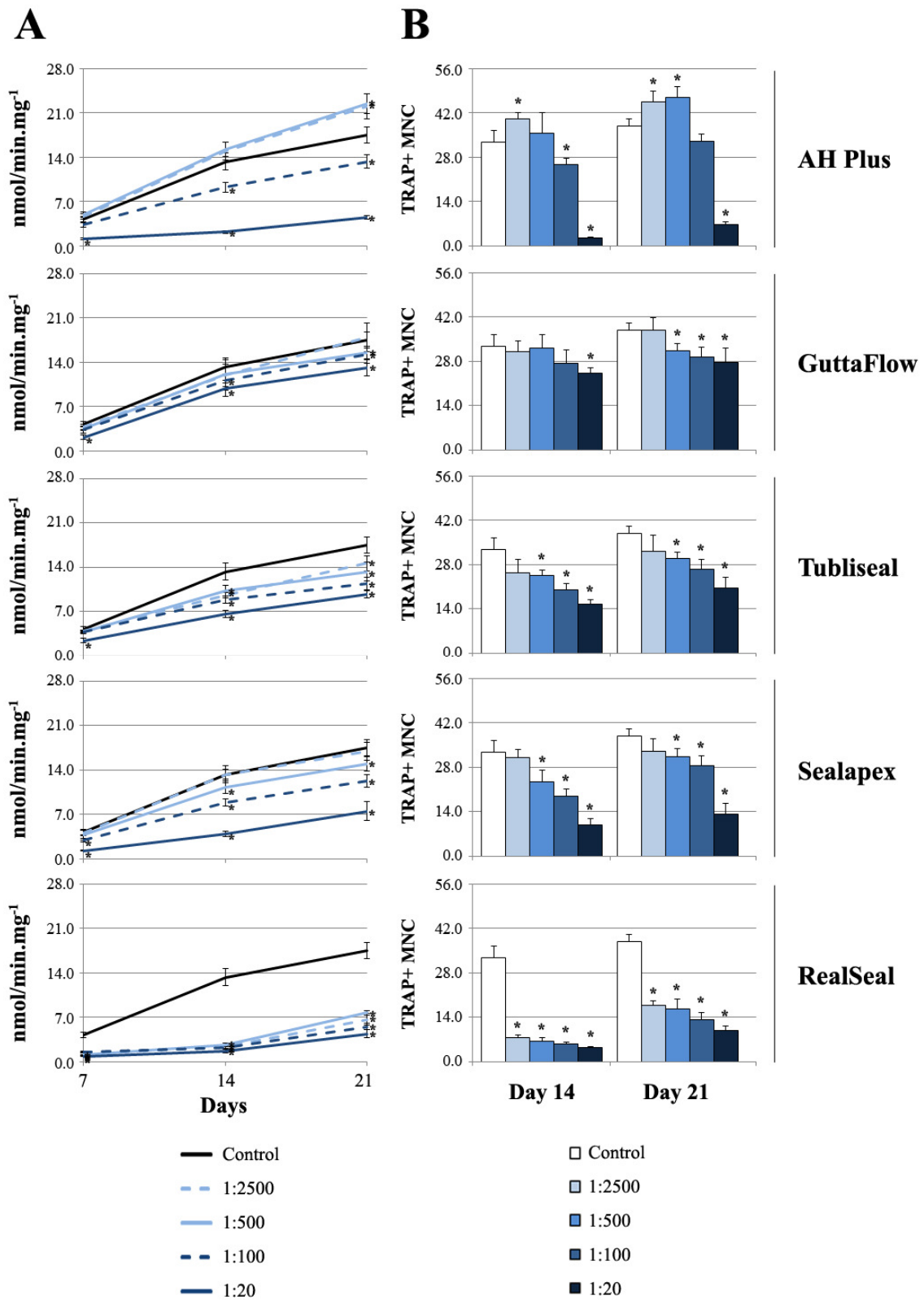
Data were obtained from three separate experiments, each one performed in triplicate, using cell cultures from different donors. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Groups of data were evaluated using a two-way analysis of variance (ANOVA) and no significant differences in the pattern of the cell behavior were found. Statistical differences between controls and experimental conditions were assessed by Bonferroni's method. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. *TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells*

#### *Unstimulated PBMC*

Control PBMC cultures performed in base medium displayed low values of TRAP activity (Fig. 1), which increased slightly during the culture period. AH Plus extract, at 1:2500 and 1:500, caused a stimulatory effect at day 21 (~25%); higher concentrations resulted in dose-dependent inhibitory effects. The other cements inhibited TRAP activity with time- and dose-dependent effects, at extract concentrations similar to and higher than 1:500. GuttaFlow and Tubliseal exhibited a low toxicity (slightly higher in the case of Tubliseal). Sealapex showed an evident dose-dependent inhibitory effect, whereas RealSeal exhibited the highest toxicity, with a significant deleterious effect at all concentrations, particularly between days 7 and 14. At day 21, the inhibitory effect observed in the cultures exposed to the highest extract concentration (1:20) was ~25% (GuttaFlow), ~45% (Tubliseal), ~57% (Sealapex) and ~75% (AH Plus and RealSeal). The effect of the cements extracts in the number of TRAP-positive multinucleated cells followed a pattern similar to that of TRAP activity (Fig. 1).

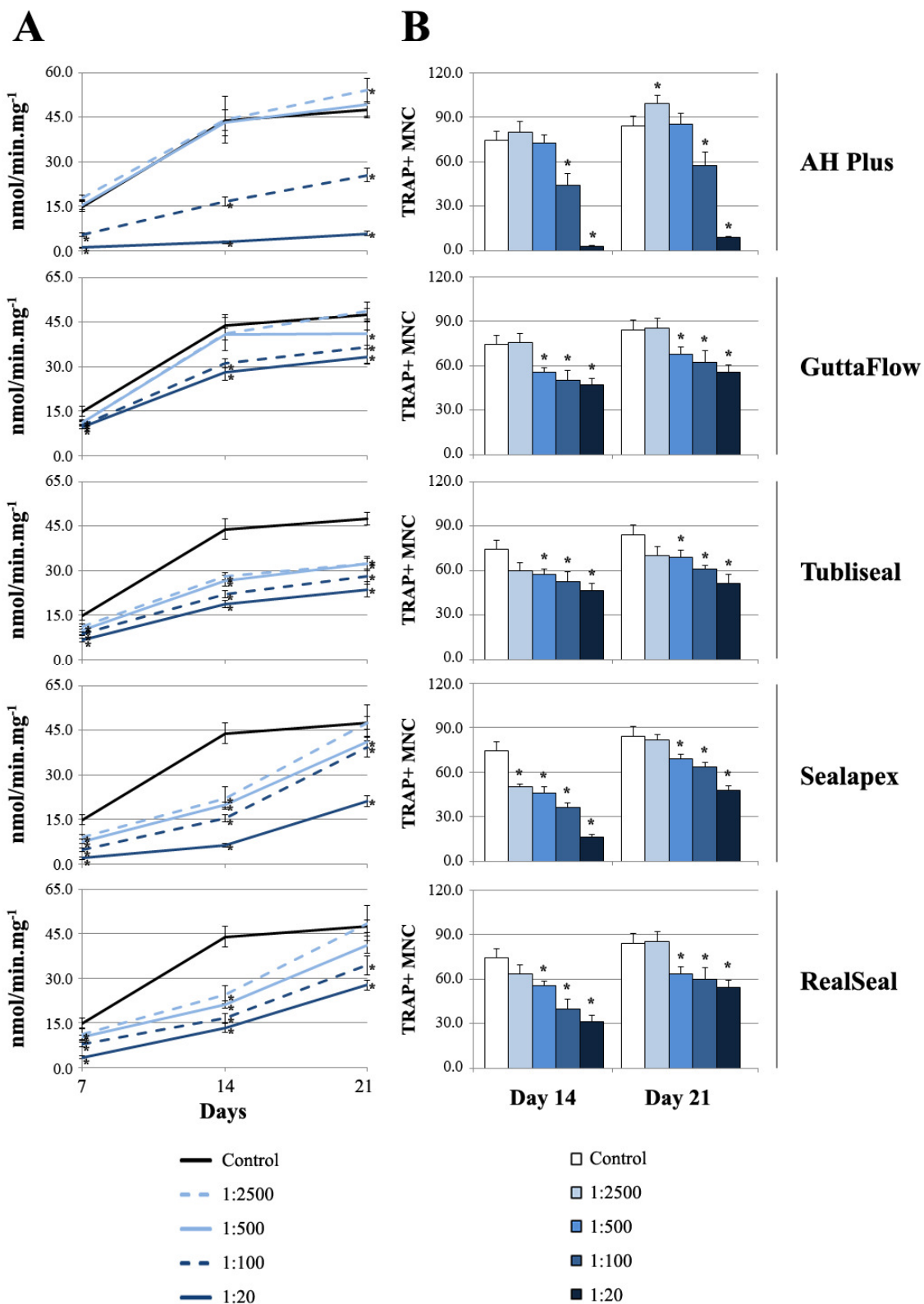


**Figure 1.** TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells of PBMC cultures performed in base medium in the presence of different elutions of root canal sealers extracts.

*Stimulated PBMC*

At control conditions, PBMC cultures supplemented with M-CSF and RANKL displayed high values of TRAP activity (Fig. 2). Enzymatic activity increased significantly from days 7 to 14, and tended to stabilize from days 14 to 21. As observed in unstimulated PBMC, AHPlus extract, at 1:2500 and 1:500, caused a slight stimulatory effect at day 21 (~15%), and inhibitory effects at higher levels. The other cements caused an inhibitory effect, however, with a different pattern of inhibition. Extracts from GuttaFlow and Tubliseal (levels  $\geq$  1:500) and AH Plus (levels  $\geq$  1:100) presented a dose-dependent inhibitory effect on TRAP activity, and the pattern of cell growth was similar to that of control, i.e. TRAP activity increased from days 7 to 14 and showed a tendency for stabilization in the last week. Thus, similar inhibitory effects were seen at days 14 and 21 in the cultures exposed to the extracts of these sealers; at the higher concentration (1:20) the percentages of inhibition at days 14 and 21 were, respectively, ~36% and ~30% (GuttaFlow), ~58% and ~50% (Tubliseal) and ~93% and 87% (AH Plus). However, the inhibitory effect of Sealapex and RealSeal showed a distinct profile; cytotoxicity was particularly evident from days 7 to 14 but, afterwards, cells tended to recover and, at day 21, the inhibitory effect was much lower than that seen on day 14. Thus, at days 14 and 21, the percentage of inhibition observed in the cultures exposed to the highest extract concentration (1:20) was, respectively, ~85% and ~55% (Sealapex) and ~70% and ~41% (RealSeal).

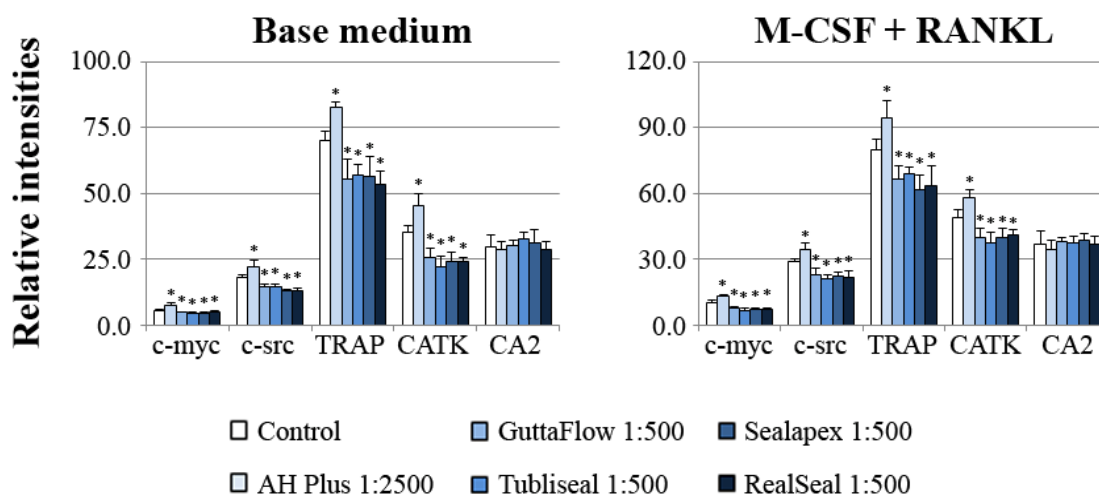
Control PBMC cultures presented a high and similar number of TRAP-positive multinucleated cells at days 14 and 21, and the effect of the sealers' extracts was identical to that observed on TRAP activity (Fig. 2).



**Figure 2.** TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells of PBMC cultures performed in medium supplemented with M-CSF and RANKL, in the presence of different elutions of root canal sealers extracts.

### 3.2. Osteoclastic gene expression

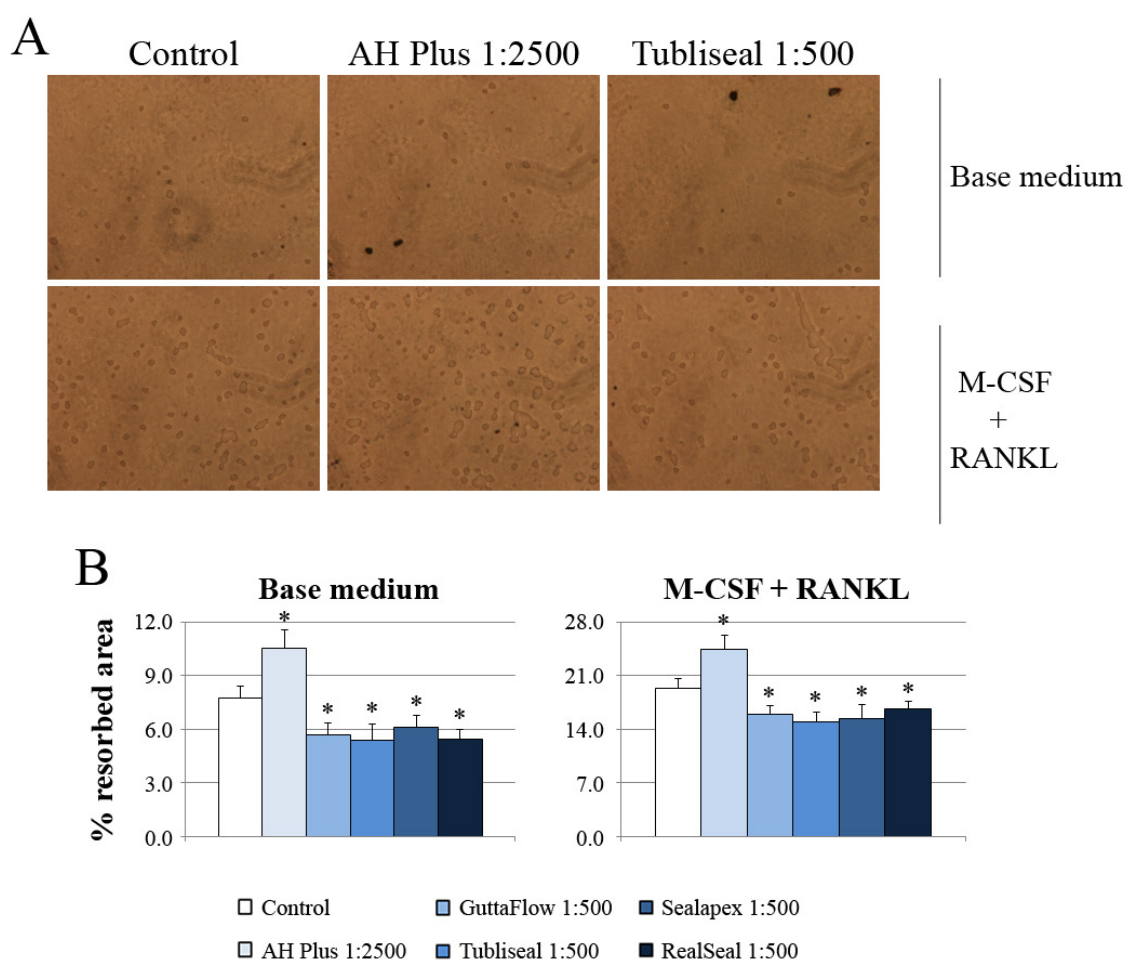
Control PBMC cultures performed in base medium or supplemented with M-CSF and RANKL, and maintained for 21 days, expressed the osteoclast-related genes c-myc, s-src, TRAP, CATK and CA2 (Fig. 3). However, supplemented cultures presented a significantly higher gene expression (Fig. 3). Shown is also the gene expression of PBMC cultures exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on TRAP activity. AH Plus caused a small increase in the expression of c-myc, s-src, TRAP and CATK, whereas the other sealers elicited a slight inhibition on the gene expression; both effects attained statistical significance. Expression of CA2 was not affected. This was observed in the cultures maintained in base medium or supplemented with M-CSF and RANKL (Fig. 3).



**Figura 3.** RT-PCR analysis of PBMC cultures maintained in base medium or in the presence of M-CSF and RANKL, exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on TRAP activity, compared to control (AH 1:2500; GF, RS, S e T 1:500). RT-PCR products were subjected to a densitometric analysis and were normalized to the corresponding GAPDH value.

### 3.3. Calcium phosphate resorption activity

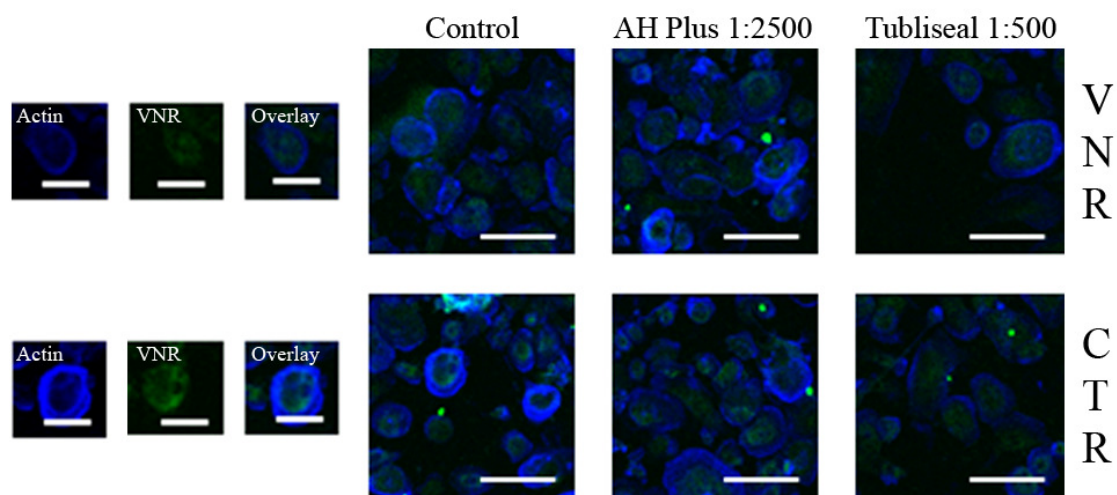
PBMC cultures maintained in base medium displayed the presence of few and isolated resorption lacunae, resulting in a small resorbed area, but the presence of M-CSF and RANKL increased significantly the total resorbed area (Fig. 4). Both in unstimulated and stimulated PBMC cultures, AH Plus caused a higher resorption activity (around 47% and 29%, respectively). All the other sealers caused a small, but significant, inhibitory effect (around 15%).



**Figure 4.** Calcium phosphate resorbing ability of PBMC cultures maintained in the absence (control) or presence of root canal sealers extracts. The cultures were exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on TRAP activity, compared to control (AH 1:2500; GF, RS, S e T 1:500). PBMC cultures were grown in base medium or supplemented with M-CSF and RANKL. After 21 days culture time over calcium phosphate layers, resorption lacunae were identified (A) and total resorbed area was quantified (B).

### 3.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

At day 21, control PBMC cultures performed in base medium showed few cells with a positive staining for F-actin and for VNR or CTR (not shown). CLSM images showed that cultures supplemented with M-CSF and RANKL exhibited a high number of cells presenting these osteoclastic features (Fig. 5). Shown is also the appearance of cultures exposed to AH Plus (1:2500) and Tubliseal (1:500), sealers that, at these extract concentrations, caused respectively a stimulatory and an inhibitory effect on TRAP activity.



**Figura 5.** Representative CLSM images showing osteoclastic cells stained blue for actin and green for VNR or CTR (OL, overlay).

## 3.5. Osteoclastogenic intracellular mechanisms

*Unstimulated PBMC.*

In control cultures, all inhibitors elicited a decrease on TRAP activity, except indomethacin. U0126 inhibitory profile was not affected by AHPlus and Tubliseal, was decreased by GuttaFlow, and was increased by Sealapex (at day 14) and RealSeal (at day 21). PDTC inhibition was lower in the presence of all the cements. GO6983 elicited a lower inhibition on PBMC cultures exposed to AHPlus (at day 21), but a higher inhibition was observed with the other cements. The inhibitory response induced by SP600125 was higher in the presence of AHPlus, Tubliseal and Sealapex, was not affected by GuttaFlow, and was lower in the presence of RealSeal. SB202190 induced a lower inhibition in PBMC cultures treated with AHPlus, Sealapex and RealSeal, while an opposite response was observed for those treated with GuttaFlow (at day 21) and Tubliseal. PD98,059 inhibitory effect was potentiated by all the cements, except for RealSeal. Indomethacin elicited a significant inhibition in all tested conditions. Results are detailed in tables 4 and 5.

Inhibitor		% of inhibition					
		Control	AHPlus 1-2500	GuttaFlow 1-500	Tubliseal 1-500	Sealapex 1-500	RealSeal 1-500
U0126 1 $\mu$ M	Day 14	61.15 $\pm$ 2.88	61.49 $\pm$ 7.08	48.89 $\pm$ 6.44	76.82 $\pm$ 7.55	82.1 $\pm$ 9.92	58.68 $\pm$ 2.39
	Day 21	68.93 $\pm$ 5.54	69.87 $\pm$ 6.88	49.85 $\pm$ 6.17	75.44 $\pm$ 8.93	74.20 $\pm$ 7.01	89.12 $\pm$ 9.89
PDTC 10 $\mu$ M	Day 14	100.00	49.13 $\pm$ 4.51	49.48 $\pm$ 7.51	53.65 $\pm$ 3.22	81.81 $\pm$ 8.36	79.28 $\pm$ 7.15
	Day 21	100.00	86.47 $\pm$ 9.11	55.24 $\pm$ 5.57	51.82 $\pm$ 7.72	94.30 $\pm$ 5.51	93.39 $\pm$ 6.61
GO6983 5 $\mu$ M	Day 14	41.16 $\pm$ 4.59	51.99 $\pm$ 9.01	58.00 $\pm$ 5.77	42.72 $\pm$ 7.46	68.55 $\pm$ 5.04	70.25 $\pm$ 5.35
	Day 21	48.95 $\pm$ 5.24	26.42 $\pm$ 2.95	60.46 $\pm$ 9.20	77.01 $\pm$ 4.92	51.92 $\pm$ 8.11	86.26 $\pm$ 10.73
SP600125 10 $\mu$ M	Day 14	49.52 $\pm$ 2.12	59.79 $\pm$ 4.13	62.62 $\pm$ 5.94	86.97 $\pm$ 4.97	67.40 $\pm$ 4.19	0.00
	Day 21	54.96 $\pm$ 4.52	74.73 $\pm$ 10.79	54.09 $\pm$ 5.97	81.03 $\pm$ 6.66	83.11 $\pm$ 7.98	3.04 $\pm$ 0.31
SB202190 5 $\mu$ M	Day 14	3.91 $\pm$ 1.39	0.00	3.27 $\pm$ 0.35	78.05 $\pm$ 5.81	16.85 $\pm$ 1.70	0.00
	Day 21	12.46 $\pm$ 1.97	0.00	21.72 $\pm$ 3.05	64.03 $\pm$ 4.77	0.00	0.00
PD98,059 10 $\mu$ M	Day 14	42.40 $\pm$ 4.75	69.41 $\pm$ 5.87	87.69 $\pm$ 6.66	50.98 $\pm$ 8.01	86.52 $\pm$ 7.96	4.69 $\pm$ 0.89
	Day 21	62.47 $\pm$ 3.88	81.99 $\pm$ 9.7	93.25 $\pm$ 6.75	73.14 $\pm$ 6.58	86.54 $\pm$ 10.00	62.95 $\pm$ 8.48
Indomethacin 1 $\mu$ M	Day 14	4.83 $\pm$ 0.64	19.20 $\pm$ 1.75	36.72 $\pm$ 4.26	27.76 $\pm$ 4.43	29.01 $\pm$ 2.17	0.00
	Day 21	0.00	19.9 $\pm$ 1.49	39.79 $\pm$ 6.06	21.83 $\pm$ 3.04	48.68 $\pm$ 5.38	29.83 $\pm$ 2.38

Table 4. Involvement of MEK, NF $\kappa$ B, PKC, JNK, p38 and MAPKK signaling pathways, and PGE2 production on PBMC cultures treated with the cements and maintained in base medium.



Tubulifer		% of Inhibition					
		Control	AHPlus 1:2500	GuttaFlow 1:500	Tubliseal 1:500	Sealapex 1:500	RealSeal 1:500
U0126 1 $\mu$ M	Day 14	38.59±6.95	51.11±7.10	90.09±8.11	41.89±7.17	65.99±7.00	55.42±7.42
	Day 21	42.43±4.91	26.06±4.13	89.83±6.68	46.42±5.08	77.71±8.25	80.66±6.59
PDTC 10 $\mu$ M	Day 14	100.00	70.99±5.14	92.90±7.70	16.38±2.08	34.80±5.63	75.40±4.91
	Day 21	100.00	81.68±4.59	95.35±4.68	31.15±3.33	90.84±8.16	92.85±7.17
GO6983 5 $\mu$ M	Day 14	43.29±4.37	36.06±4.21	65.24±9.63	63.92±7.24	68.88±5.53	49.58±6.66
	Day 21	29.71±1.16	20.35±2025	65.62±4.13	68.28±7.20	71.00±6.57	70.17±8.89
SP600125 10 $\mu$ M	Day 14	53.15±5.59	40.57±6.04	65.75±7.02	72.08±5.58	30.25±3.75	22.72±2.70
	Day 21	58.09±2.21	11.88±1.46	72.58±4.89	65.93±5.54	56.92±5.26	49.19±6.15
SB202190 5 $\mu$ M	Day 14	78.15±10.04	0.00	10.74±1.27	38.38±2.98	0.00	20.83±2.93
	Day 21	94.08±5.92	0.64±0.08	9.86±1.00	42.20±4.95	0.00	0.00
PD98,059 10 $\mu$ M	Day 14	0.00	71.41±8.05	70.91±6.64	91.99±5.88	69.75±8.19	69.78±2.07
	Day 21	3.54±0.52	90.94±5.89	93.92±6.68	90.94±8.66	82.00±6.11	80.93±8.59
Indomethacin 1 $\mu$ M	Day 14	0.00	2.31±0.31	0.00	29.02±4.04	31.31±3.93	0.00
	Day 21	10.78±0.23	0.00	5.13±0.70	19.65±1.41	53.94±3.52	3.61±0.38

**Table 5.** Involvement of MEK, NFkB, PKC, JNK, p38 and MAPKK signaling pathways, and PGE2 production on PBMC cultures treated with the cements and maintained in the presence of M-CSF and RANKL.

#### *Stimulated PBMC.*

Control cultures revealed a strong decrease on TRAP activity in the presence of U0126, GO6983, SP600125 and SB2020190, that was total following PDTC treatment. PD98,059 and indomethacin did not affect the cellular behavior. Comparatively, U0126 inhibition was lower in the presence of AHPlus (at day 21), identical with Tubliseal, and higher with GuttaFlow, Sealapex and RealSeal. PDTC inhibitory profile was decreased by AHPlus and Tubliseal, while not significantly affected by the remaining cements. The inhibition induced by GO6983 was potentiated by all the cements, except in the case of AHPlus. Following treatment with SP600125, the decrease on cellular response was lower in the presence of AHPlus and RealSeal (at day 14), but higher with GuttaFlow, Tubliseal and Sealapex (at day 21). All the extracts decreased the inhibition elicited by SB202190, while increased the one caused by PD98,059. Indomethacin inhibitory effect was only significantly affected (increased) by Tubliseal and Sealapex .

Globally, the presence of TRAP+ multinucleated cells on the different experimental conditions was in line with the results observed for TRAP activity, wither in BM or M+R PBMC cultures (data not shown).

#### 4. Discussion

In this work, differentiation and function of human peripheral osteoclast precursors were evaluated in the presence of a concentration range of the extracts of five endodontic sealers, based on distinct compositions. Clinically, the sealers are applied as freshly mixed materials, and the unset material might contact with apical and periapical tissues. Thus, the extracts were obtained by incubating the freshly mixed material with culture medium, and tested for time and dose-dependent effects.

In physiological conditions, osteoclastogenesis is a complex process in which paracrine mechanisms play a significant role. Among the wide variety of regulator factors, M-CSF and RANKL are particularly relevant. M-CSF is important for the earlier steps of osteoclastogenesis, mainly increasing osteoclastic precursor survival<sup>20</sup> and promoting RANK expression on those precursors, in order to initiate RANKL-mediated osteoclastic differentiation<sup>21,22</sup>. RANKL is a factor essential for the later osteoclastogenic steps, mainly for osteoclastic differentiation<sup>22</sup>, but also for the survival of mature osteoclasts<sup>22</sup>. Accordingly, the present results showed that in unstimulated conditions (absence of M-CSF and RANKL), PBMC cultures exhibited low osteoclastic features, i.e. regarding TRAP activity, number of TRAP-positive multinucleated cells, expression of osteoclastic genes and resorption activity. The presence of M-CSF and RANKL increased significantly osteoclast differentiation and function, which is expected considering the role of these factors on osteoclastogenesis. Considering this, the effects of the sealers' extracts were studied in unstimulated and stimulated conditions (absence or presence of M-CSF and RANKL), aiming to get information on eventual differences of the sealers' toxicity profile regarding immature/undifferentiated precursors and also on precursors committed and undergoing osteoclastogenic differentiation.

PBMC cultures were significantly affected by the sealers' extracts, as shown by the results regarding TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells. Both in unstimulated and stimulated PBMC cultures, AHPlus, at the lower concentrations, caused a small stimulatory effect, reflecting most probably an adaptive cell response to cope with the presence of toxic compounds; however, higher levels caused significant toxic effects. All the other sealers exhibited inhibitory effects, with differences on the dose- and time-dependent effects. AHPlus (at the two higher concentrations), GuttaFlow and Tubliseal exhibited a similar pattern, reflected as an

inhibition on TRAP activity during the first two weeks, and a relative stabilization of the cell behavior afterwards. Sealapex and RealSeal also caused an inhibition until day 14, but afterwards cells were able to recover completely or partially from the inflicted toxicity. This suggests that cells were able to trigger adaptive mechanisms to the presence of the sealers, apparently, more efficient in the case of Sealapex and RealSeal.

In the clinical setting, direct contact with the root filling materials and the apical and periapical tissues involves a small contact area, and the leachable cytotoxic compounds are continually cleared by the extracellular fluids. Also, these materials remain in contact with the surrounding tissues for years or decades. Thus, in terms of predicting the long-term clinical effects of the sealers, exposure of bone cells to low concentrations of the sealers' extracts appears to be a more representative situation. In this context, PBMC cultures were exposed to the lowest tested concentration that elicited statistically significant effects on TRAP activity, and were further characterized for a set of osteoclast parameters. Results showed that these concentrations were 1:2500 for AHPlus, which caused small stimulatory effects and 1:500 for the other sealers, which was associated with an inhibition of the cell response. In these conditions, the sealers' extracts affected the expression of the differentiation and activation genes *c-myc* and *c-src* and the functional genes TRAP and CATK, that was in line with those observed for TRAP activity. The same was found for the presence of actin rings, vitronectin and calcitonin receptors, and calcium phosphate resorbing activity. In addition, the relative contribution of some of the osteoclastogenic-related signaling pathways was sharply affected by the cements' extracts. In unstimulated PBMC, NFκB pathway was significantly down regulated by AHPlus, GuttaFlow and Tubliseal. JNK pathway appeared to have no significant relevance in PBMC cultures treated with RealSeal, but in the presence of Tubliseal JNK and p38 pathways seemed to be especially important. MAPKK pathway and PGE2 production appeared to be particularly involved in the osteoclastogenic response modulated by GuttaFlow and Sealapex. In stimulated PBMC, GuttaFlow elicited a significant increase in the relevance of MEK pathway. Tubliseal caused a down regulation of NFκB pathway. All the cements except AHPlus induced an increase on the involvement of PKC pathway. p38 appeared to be significantly less involved in the osteoclastogenic response in the presence of the cements, while the opposite situation was observed for MAPKK pathway. PGE2 production seemed to be important only following Sealapex treatment.

Several aspects have to be considered in the assessment of the endodontic sealers cytocompatibility, i.e. composition and leachable components, setting characteristics, stability of the set sealer and the contact between the sealer and the surrounding tissues. A wide variety of studies have been performed involving many sealers, but differing in the target cell type, preparation of the extracts, tested concentrations and time of exposure, which is reflected by a great discrepancy of results regarding the establishment of cytotoxicity patterns or the effects on a specific cell type. However, the results of the present work agree with most of the reported studies, which also showed inhibitory effects of endodontic sealers in several cell types. GuttaFlow is a silicone-based sealer manufactured by adding gutta-percha powder to the silicone matrix, and containing nanosilver particles as a preservative. The low cytotoxicity observed in the present work is in line with a variety of studies involving fibroblasts<sup>23,24,25,26,27,28</sup>, and might result from the release of nanosilver particles as they have been associated with dose-dependent cytotoxic effects<sup>29</sup>. It is also reported the presence of small voids within the core of GuttaFlow, which favour the release of unreacted compounds that accumulates in such pores<sup>30</sup>. Regarding AHPlus, an epoxy resin-based sealer apparently “formaldehyde-free”, is reported to exhibit a moderate to severe toxicity immediately after mixing (the conditions used in the present work) in fibroblasts<sup>23,24,25,27,28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37</sup>, human periodontal ligament cells<sup>33, 38</sup> and osteoblasts<sup>36,39,40</sup>. The toxicity of this sealer has been mostly associated to the release of low levels of formaldehyde, the presence of amines added to accelerate the epoxy polymerization and the epoxy resin content<sup>24,41</sup>. The toxicity of Tubliseal, a zinc oxide eugenol-based sealer was demonstrated in fibroblasts<sup>27, 42</sup> and human periodontal ligament cells<sup>43</sup>, and has been attributed to free eugenol release, and also several additives, namely resins used for greater dentin adhesion<sup>29</sup>. Sealapex is a calcium hydroxide based sealer and its cytotoxicity is widely reported, namely in fibroblasts<sup>37,44,45</sup>, human periodontal ligament cells<sup>38,43</sup> and osteoblasts<sup>46,47</sup>. It has been attributed to an increase in the pH of the culture medium resulting from the sealer dissolution<sup>29,48,49</sup>. In the present work, the pH remained constant throughout the culture time, due to the low tested levels, and other components such as polyresin, zinc oxide and Ba<sup>2+</sup> have been suggested as potential toxic compounds<sup>50</sup>. Most of the studies performed with RealSeal reported a rather cytotoxic effect of this dual-cured hydrophilic multi-methacrylate resin-based sealer, namely in fibroblasts<sup>23,24,25,35, 36,45,51,52,53</sup>, human dental pulp cells<sup>53</sup> and osteoblasts<sup>36,54,55</sup>, suggesting that it is caused

by the leaching of unreacted monomers as a result of incomplete polymerization, and also filler particles due to the degradation of the sealer.

Regarding bone cells, few studies were performed, and all involved osteoblastic cells. Considering the sealers studied in the present work, AHPlus has been tested in human U2-OS osteosarcoma cells<sup>39,56</sup> and in the rat cell lines MC3T3-E1 and ROS 17/2.8<sup>36,40</sup>, whereas Sealapex was addressed in rat calvarial osteoblasts<sup>46</sup> and MC3T3-E1 cells<sup>3</sup> and RealSeal was studied in MG63 cells<sup>55</sup> and MC3T3-E1 and ROS 17/2.8 cells<sup>36,54</sup>. To the best of our knowledge, no studies have been described addressing the effects of the sealers on osteoclast cells, which is of utmost relevance considering the intimate relationship between the two cells types in bone metabolism. In the present work, addressing long-term effects of different sealers' extracts on osteoclastogenesis, results observed until day 14 might be considered as reflecting acute/short-term effects, and showed dose-dependent inhibitory effects, whereas data collected on day 21 provides information regarding a longer exposure time, evidencing the ability of adaptive cell responses to the sealers' extracts. Due to the differences on the time-dependent effects of the different sealers, it is not easy to establish an order of toxicity. However, evident results were the low toxicity of GuttaFlow (both in unstimulated and stimulated PBMC cultures), the high deleterious effect of RealSeal in unstimulated cultures, and the severe cytotoxicity of the highest concentration of AHPlus in both unstimulated and stimulated conditions.

## 5. Conclusion

The sealers' extracts caused inhibitory effects on human osteoclast differentiation and function. The sealers differed on the dose- and time-dependent profile, and also in the involved intracellular signaling pathways. However, following long-term exposure an adaptive cell response was noticed. This observation, together with the lower toxicity expected in *in vivo* conditions due to the continuous fluids flow and sealers' clearance, suggests that after a variable time-period the cytotoxicity of the sealers eluates on osteoclast cells might be greatly minimized.

## References

---

- <sup>1</sup>Datta HK et al. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008; 61: 577–87.
- <sup>2</sup>Awadhi et al. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endodon* 2004;30: 527- 33.
- <sup>3</sup>Lee DH et al. Mechanism of root canal sealers cytotoxicity on osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2007;104: 717- 21.
- <sup>4</sup>Xu P et al. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endodon* 2010; 36: 40-44.
- <sup>5</sup>Pertot WJ et al. Comparison of the intraosseous biocompatibility of dyract and super EBA. *J Endodon* 1997;23: 315- 19.
- <sup>6</sup>Torabinejad M et al. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of Guinea pigs. *J Endodon* 1998;24: 468-71.
- <sup>7</sup>Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473: 201- 9.
- <sup>8</sup>Vaananen, HK. and Laitala-Leinonen T, Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys*, 2008; 473: 132-8.
- <sup>9</sup>Zaidi, M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007; 13(7): 791-801.
- <sup>10</sup>Costa-Rodrigues J et al. Characterization of the osteoclastogenic potential of human osteoblastic and fibroblastic conditioned media. *J Cell Biochem* 2010; 109(1): 205-16.
- <sup>11</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes MH. Paracrine-mediated differentiation and activation of human hematopoietic osteoclast precursor cells by skin and gingival fibroblasts. *Cell Prolif* 2011; 44: 264–73.
- <sup>12</sup>Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40: 251- 64.
- <sup>13</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. *J Cell Biochem* 2011;112: 3704-13.
- <sup>14</sup>Costa-Rodrigues J et al. Hydroxyapatite surface roughness: Complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. *Acta Biomater*, 2012;8:1137-45.
- <sup>15</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(-) cell fractions. *Cell Prolif* 2011;44:410-19.
- <sup>16</sup>Costa-Rodrigues, J et al. Variability of the paracrine-induced osteoclastogenesis by human breast cancer cell lines. *J Cell Biochem*, 2012; 113:1069-79.
- <sup>17</sup>Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem* 1976;72: 248–54.
- <sup>18</sup>Zhao Q et al. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007; 12: 2519–29.
- <sup>19</sup>Teitelbaum SL and Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 2003; 4(8): 638-49.
- <sup>20</sup>Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 628-638.

- 
- <sup>21</sup>Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342.
- <sup>22</sup>Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys* 2008; 473: 139–146.
- <sup>23</sup>Bouillaguet S et al. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endodon* 2006;32: 989- 92.
- <sup>24</sup>Eldeniz AU et al. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide-, and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingival and L929 cell lines. *Int Endodon J* 2007; 40: 329- 37.
- <sup>25</sup>Brackett MG et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endodon J* 2008;41: 1072- 78.
- <sup>26</sup>Ashraf H, Taherian A and Kerdar AN. Evaluation of cytotoxicity of two root canal filling materials by MTT assay. *Aust Endod J* 2010;36: 24- 28.
- <sup>27</sup>Zoufan K et al. Cytotoxicity evaluation of GuttaFlow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2011;112:657-61.
- <sup>28</sup>Willershausen I et al. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & Face Med* 2011;7: 15.
- <sup>29</sup>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; 36:147-60.
- <sup>30</sup>Elayouti A et al. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endod* 2005; 31: 687-90.
- <sup>31</sup>Cohen BI et al. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endodon* 2000; 28: 228-29.
- <sup>32</sup>Miletić I et al. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 287- 90.
- <sup>33</sup>Schwarze T et al. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endodon* 2002; 28: 784- 86.
- <sup>34</sup>Miletić I et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J Endodon* 2005;31: 307- 9.
- <sup>35</sup>Lodienè G et al. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endodon J* 2008; 41: 72-7.
- <sup>36</sup>Brackett MG et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mat Res B: Appl Biomater* 2010; 95B:380- 86.
- <sup>37</sup>Silva EJNL et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endodon J* 2012; 45: 49- 56.
- <sup>38</sup>Huang FM et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endodon J* 2002;35: 153- 58.
- <sup>39</sup>Huang FM, Chou MY and Chang YC. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression by epoxy resin and zinc oxide-eugenol based root canal sealers in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2003;24: 1869- 75.
- <sup>40</sup>Bryan TE et al. In Vitro osteogenic potential of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endodon* 2010; 36: 1163-69.

- 
- <sup>41</sup>Merdad K et al. Short term cytotoxicity assesement of components of the Epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct Millipore filter assays. *J Endodon* 2007;33: 24- 7.
- <sup>42</sup> Ersev H et al. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. *J Endodon* 1999;25: 358-63.
- <sup>43</sup>Chang MC et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblast. *Int Endodon J* 2010;43: 251- 57.
- <sup>44</sup>Beltes P et al. In Vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1995;11: 245-249.
- <sup>45</sup>Key JE, Rahemtulla FG and Eleazer PD. Cytotoxicity of new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endodon* 2006;32: 756- 58.
- <sup>46</sup>Al-Awadhi S et al. Cultured primary osteoblasts viability and apoptosisi in the presence of root canal sealers. *J Endodon* 2004;30: 527- 33.
- <sup>47</sup>Lee DH et al. Mechanisms of root canal sealers cytotoxicity on osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2007;104: 717- 21.
- <sup>48</sup>Duarte MAH et al. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *J Endodon* 2000;26: 389- 90.
- <sup>49</sup>Eldeniz AU et al. Evaluation of pH and ion release of Acroseal sealer in comparision with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2007; 103: e86- e91.
- <sup>50</sup>Takahara K, Onodera A, Matsumoto K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:200-7.
- <sup>51</sup>Susini G et al. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int End J* 2006; 39: 940- 44.
- <sup>52</sup> Donadio M et al. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2009; 107: e74- e78.
- <sup>53</sup>Karapinar-Kazandağ M et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endodon J* 2011; 44: 626- 34.
- <sup>54</sup>Ames JM et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self cured mode. *J Endodon* 2009; 35: 225- 28.
- <sup>55</sup> Xu P et al. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast like MG63 cells. *J Endodon* 2010;36: 40- 44.
- <sup>56</sup>Huang FM et al. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endodon* 2005; 31: 679-683.



## **CAPÍTULO III**

**Behaviour of co-cultured human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers**



## 1. Introduction

Root canal sealers are widely used worldwide, in endodontic procedures. Although they are intended to be contained within the root canal space, they may extrude through the apical constriction, or eluents from the sealers may come in contact with periradicular tissues. This may cause irritation and delay in wound healing<sup>1</sup>. Moreover, the contact of root canal filling materials with periapical tissues can also affect the normal bone metabolic activities by direct effects on osteoblastic and osteoclastic cells, which might impair local bone regeneration and remodeling. Regarding this, several *in vitro* studies addressed the effect of endodontic sealers in different osteoblastic cell systems, namely in human U2-OS osteosarcoma cells<sup>2,3,4,5,6</sup>, human MG63 osteosarcoma cells<sup>7</sup>, rat cell lines MC3T3-E1 and ROS 17/2.8<sup>5,8,9,10,11</sup> and rat calvarial osteoblasts<sup>12</sup>, differing on the tested sealers and the exposure protocol. Most of them involved short-term exposures and reported inhibitory effects in the viability/proliferation of osteoblastic cells and in functional parameters such as the alkaline phosphatase activity. Some studies suggested that the sealers eluents might interfere with the production of molecules, such as COX-2<sup>2</sup>, IL-6 and IL-8<sup>3</sup>, gelatinases<sup>4</sup> and RANKL<sup>5</sup>, which are involved in signaling pathways and cellular crosstalks within the bone environment.

Bone tissue is constantly being moulded and shaped by the coordinated action of bone-resorbing osteoclasts and bone-synthesizing osteoblasts<sup>13</sup>. Both cell types are involved in reciprocal crosstalks that modulate the differentiation and function of each other<sup>13,14</sup>, which are essential to maintain an adequate bone mass and/or structure. Therefore, for *in vitro* bone-related research, osteoclast/osteoblast co-cultures appear as attractive experimental models, because they are one step closer to natural conditions and allow elucidation of some aspects of the complex interactions between bone-building and bone-resorbing cells. Accordingly, some recent reports stressed the relevance of these co-culture systems, as more representative models to address *in vitro* bone metabolism studies<sup>14,15,16</sup>. Despite the high relevance of this issue, to the best of our knowledge, the effects of endodontic sealers on human osteoclastic and osteoblastic cells in a co-culture system have not been reported.

In this context, this study addresses the long-term effects of five root canal sealers' extracts, based on distinct compositions (AH Plus<sup>TM</sup>, GuttaFlow<sup>TM</sup>, Tubliseal<sup>TM</sup>, Sealapex<sup>TM</sup> and RealSeal<sup>TM</sup>), on co-cultures of human osteoclastic and osteoblastic cells. These cultures were established from human peripheral blood

mononuclear cells and bone marrow cells, respectively. Co-cultures were assessed for osteoclastic and osteoblastic parameters, and also for the involvement of several intracellular signaling pathways.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Root canal sealers and preparation of the extracts

The following endodontic sealers were tested:

- GuttaFlow™ (Roeko, Coltène/Whaledent) – silicone-based sealer with gutta-percha
- AH Plus™ (DentsplyDetrey) – epoxy resin-based sealer
- Sealapex™(SybronEndo) – calcium hydroxide-based sealer
- Tubliseal™ (SybronEndo) – zinc oxide eugenol-based sealer
- RealSeal™(SybronEndo) – methacrylate resin-based sealer

Composition of the sealers is shown in Table 1.

GuttaFlow™	AH Plus™	Sealapex™
Gutta-percha powder	Paste A:	Active ingredients- Base:
Polydimethylsiloxane	Bisphenol-A epoxy resin	Calcium oxide
Silicone oil	Bisphenol-F epoxy resin	Zinc oxide
Paraffin oil	Calcium tungstate	Active ingredients- Catalyst:
Platinum catalyst	Zirconium oxide	Disalicylate resin
Zirconium dioxide	Silica	Trisalicylate resin
Nano-silver (preservative)	Iron oxide pigments	Isobutyl salicylate
Coloring	Paste B:	Mixed:
	Dibenzyl diamine	Calcium oxide (24%)
	Amino adamantane	Barium sulphate (20%)
	Tricyclodecane-diamine	Zinc oxide (7%)
	Zirconium oxide	Sub-micron silica (4%)
	Silica	Titanium dioxide (2%)
	Silicone oil	Zinc stearate (1%)
Tubliseal™	RealSeal™	
Active ingredients- Base:	Mixture of UDMA, PEGDMA, EBPADMA and BISGMA resins	
Zinc oxide	Silane-treated bariumborosilicate glasses *	
	*(contains a small amount of aluminium oxide barium sulfate)	
Active ingredients- Catalyst:	Silica	
Eugenol	Barium sulfate	
	Calcium hydroxide	
	Bismuth oxychloride with amines	
Mixed:	Peroxide	
Zinc oxide (59%)	Photo initiator	
Barium sulphate (4%)	Stabilizers	
Oleo resin (14%)	Pigments	
Thymol iodide (3%)		
Oil 8(%)		
Modifiers (2%)		
Eugenol (10%)		

**Table 1.** Composition of the tested root canal sealers.

The sealers' extracts were prepared according to ISO Standards 10993-5 (surface/medium rate: 0.5 - 6.0cm<sup>2</sup>/ml; extraction time: 1- 3 days). The sealers were mixed according to the manufacturer's instructions under aseptic conditions. With an insulin syringe, 0.3ml of each sealer was placed at the bottom of the well of a 24-well plate (Orange Scientific, Belgium) and the surface of the material was smoothed. Immediately after, 1.5ml of culture medium was added to each well. The medium consisted of  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B and with 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. The plates were kept for 24h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/air. Following, culture medium was collected, diluted (1:20, 1:100, 1:500, 1:2500), aliquoted and frozen at -20°C. In this concentration range, the pH of the culture medium remained constant (pH ~7.4).

## 2.2. Co-cultures of osteoclastic and osteoblastic cells. Exposure to the extracts.

Osteoclast cell cultures were established from precursors present in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from blood of healthy male donors (25–35 years old), after informed consent, as described before<sup>17</sup>. Briefly, blood was diluted with phosphate buffered saline (PBS) (1:1) and applied on top of Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio Sciences). Samples were centrifuged at 400g for 30 min. PBMCs were collected at the interface between Ficoll-Paque and PBS and washed twice with PBS. On average, for each 100 ml of processed blood, ~70 x 10<sup>6</sup> PBMCs were obtained.

Osteoblast cell cultures were established from bone marrow obtained from patients (25–35 years old) undergoing orthopedic surgery procedures, after informed consent<sup>18</sup>. Human bone marrow cells (hBMCs) were cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 2.5  $\mu$ g/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. At about 70-80% confluence, cells were enzymatically detached with 0.05% trypsin and 0.5mM EDTA and seeded as described below.

For the co-culture, hBMCs were seeded (1x10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>) and cultured for 24 hours in the conditions used for the culture of osteoblastic cells. Following, PBMC were added (1.5x10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>) and co-cultures were maintained in the conditions described for PBMC cultures. Seeding densities and culture conditions were selected based in previous studies<sup>19</sup>. After 24 h, culture medium was removed and replaced by one

containing the sealers' extracts (1:2500, 1:500, 1:100 and 1:20). Co-cultures performed in the absence of the extracts were used as control. Cultures were maintained for 21 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Culture medium was replaced once a week and the extracts were renewed in every medium change. Co-cultures were characterized throughout the culture time for the osteoclastic and the osteoblastic response, as described previously<sup>19</sup>.

### 2.2.1. Osteoclastogenic response

Co-cultures were characterized at days 7, 14 and 21 for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and number of TRAP-positive multinucleated cells, at all extracts' concentrations (1:2500 - 1:20). In addition, for each sealer, co-cultures exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on cellular response, at day 21, were further analysed for more specific osteoclastogenic parameters. These concentrations were 1:2500 for AH Plus (which caused a stimulatory effect) and 1:500 for the other sealers (which caused an inhibitory effect).

*TRAP activity.* TRAP activity was determined by the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate (pNPP), at days 7, 14 and 21. Cell layers were solubilized (0.1% Triton X-100, 5 min), and cellular lysates were incubated with 12.5 mM pNPP in 12.5 mM tartaric acid and 0.09 M citrate (pH 4.8) for 1h at 37°C. The reaction was stopped with 5M NaOH, and the absorbance was measured at 400nm in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek). TRAP activity was normalized to total protein content (quantified by Bradford's method) and expressed as nmol/min/mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup>.

*TRAP-positive multinucleated cells.* At days 14 and 21, co-cultures were fixed (3.7% formaldehyde, 10 min) rinsed with distilled water, and stained for TRAP with acid phosphatase, leukocyte (TRAP) kit (Sigma), according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated with naphthol AS-BI 0.12 mg/ml in the presence of 6.76 mM tartarate and 0.14 mg/ml Fast Garnet GBC (37°C, 1h in the dark). After, cell layers were washed and stained with hematoxylin. TRAP-positive (purple/dark red) and multinucleated (>2 nuclei) cells were counted with Nikon TMS microscope (Nykon Instruments Inc, USA).

*Osteoclastgene expression by RT-PCR analysis.* At day 21, co-cultures were analyzed for the expression of the housekeeping gene GAPDH and the osteoclast-associated genes c-myc, c-src, TRAP, cathepsin K (CATK), and carbonic anhydrase 2 (CA2). RNA was extracted with Rneasy® Mini Kit (Qiagen) and was quantified by UV spectrophotometry at 260 nm. RNA 0.5 µg, was reverse transcribed and amplified (25 cycles) with the Titan One Tube RT-PCR System (Roche), with an annealing temperature of 55°C. The primers used are listed in Table 2. RT-PCR products were electrophoretically separated on a 1% (w/v) agarose gel and subjected to a densitometric analysis with ImageJ 1.41 software. Values were normalized to the corresponding GAPDH value.

Gene	5' Primer	3' Primer
GADPH	5'-CAGGACCAGGTTACCAACAAGT-3'	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACTGT-3'
COL1	5'-TCCGGCTCCTGCTCCTCTTA-3'	5'-ACCAGCAGGACCAGCATCTC-3'
ALP	5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3'	5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3'
BMP-2	5'-GACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'	5'-GCAATGGCCTTATCTGTGAC-3'
c-myc	5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3'	5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTG-3'
c-src	5'-AAGCTGTTCGGAGGCTTCAA-3'	5'-TTGGAGTAGTAGGCCACCAG-3'
TRAP	5'-ACCATGACCACCTTGGCAATGTCTC-3'	5'-ATAGTGGAAGCGCAGATAGCCGTT-3'
CATK	5'-AGGTTCTGCTGCTACCTGTGGTGAG-3'	5'-CTTGCATCAATGGCCACAGAGACAG-3'
CA2	5'-GGACCTGAGCACTGGCATAAGGACT-3'	5'-AAGGAGGCCACGAGGATCGAAGTT-3'

**Table 2.** Primers used on RT-PCR analysis of co-cultures.

*Calcium phosphate resorbing activity.* After 21 days of culture on BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture Plates (BD Biosciences), co-cultures were bleached with 6% NaOCl and 5.2% NaCl, according to manufacturer's instructions. Calcium phosphate layers were visualized by phase contrast light microscopy. Image analysis of the resorbed areas was performed with ImageJ 1.41 software.

*Signalling pathways.* Co-cultures were characterized for the involvement of several signalling pathways important for osteoclastogenesis<sup>20,21</sup>. Cultures were treated with the corresponding signalling pathway inhibitor, namely 1 µM U0126 (MEK), 10

$\mu\text{M}$  PDTC (NF $\kappa$ B), 5  $\mu\text{M}$  GO6983 (PKC), 10  $\mu\text{M}$  SP600125 (JNK), 5  $\mu\text{M}$  SB202190 (p38), 10  $\mu\text{M}$  PD98,059 (MAPKK) and 1  $\mu\text{M}$  Indomethacin (PGE2 production) throughout the culture time. At days 14 and 21, cultures were assessed for TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells.

### 2.2.2. Osteoblastic response

Co-cultures were characterized at days 7, 14 and 21 for alkaline phosphatase (ALP) activity at all extracts' concentrations (1:2500 - 1:20). In addition, for each sealer, co-cultures exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on ALP activity, at day 21, were further analysed for the expression of osteoblastic genes and several intracellular signalling pathways. These concentrations were 1:2500 for AH Plus, Tubliseal and Sealapex, and 1:500 for GuttaFlow and RealSeal. The response was inhibitory for all sealers' extracts.

*ALP activity.* Cell layers were solubilized (0.1% Triton X-100, 5 min), and ALP activity was evaluated in cell lysates by the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate in alkaline buffer solution, pH 10.3, and colorimetric determination of the product (p-nitrophenol) at 405 nm. Hydrolysis was carried out for 30 min at 37 °C. Results were expressed as  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$ .

*Osteoblast gene expression by RT-PCR analysis.* At day 21, co-cultures were analyzed for the expression of the housekeeping gene GAPDH and the osteoblastic genes collagen type 1 (COL1), ALP and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), using the experimental protocol describe above. The primers used are listed in Table 2.

*Signalling pathways.* Co-cultures were characterized for the involvement of several osteoblastogenesis-related signalling pathways<sup>22</sup>. Cultures were treated with the corresponding signalling pathway inhibitor, namely 1  $\mu\text{M}$  U0126 (MEK), 10  $\mu\text{M}$  SP600125 (JNK), 10  $\mu\text{M}$  IWR-1 (canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway) and 10  $\mu\text{M}$  KN-93 (CaMKII) throughout the culture time. At days 14 and 21, cultures were assessed for ALP activity.



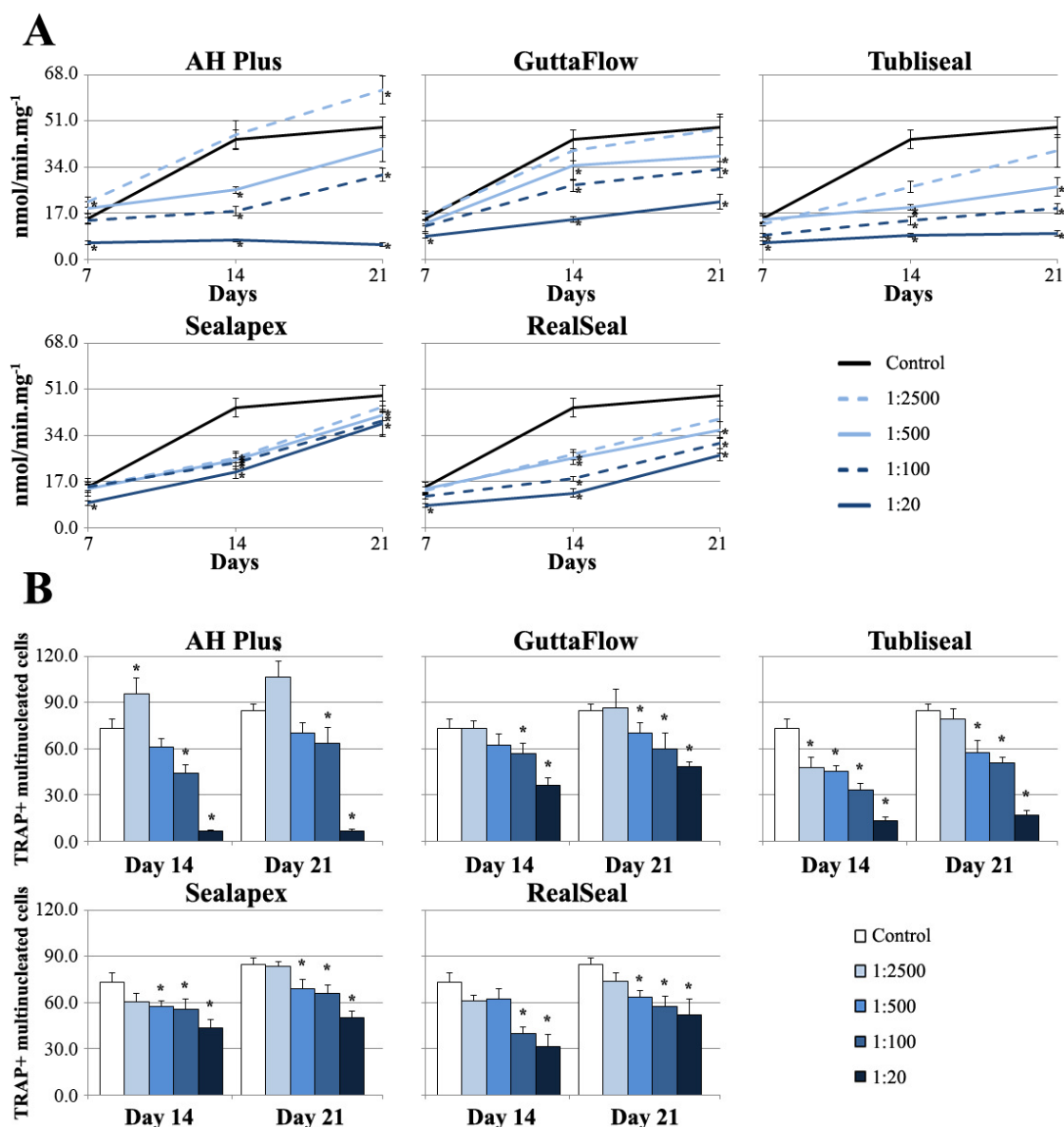
### 2.3. Statistical analysis

Data were obtained from three separate experiments, each one performed in triplicate, using cell cultures from different donors. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Groups of data were evaluated using a two-way analysis of variance (ANOVA) and no significant differences in the pattern of the cell behavior were found. Statistical differences between controls and experimental conditions were assessed by Bonferroni's method. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Osteoclastogenic response

Fig. 1A shows the dose- and time-dependent effects of the sealers' extracts on TRAP activity found in the co-cultures of osteoclastic and osteoblastic cells. At control conditions (absence of the sealers' extracts), TRAP activity increased until day 14 and stabilized from days 14 to 21. All cements caused inhibitory effects, except AH Plus at the lower extract concentration (1:2500), which elicited a stimulatory effect at day 21 (~28%). For all sealers, the inhibitory effect was more significant during the two first weeks. Afterwards, during the third week, TRAP activity tended to stabilize in the presence of GuttaFlow, and increased in the cultures exposed to the other sealers, particularly, for AH Plus and Sealapex. The inhibitory effect was dose-dependent, but the Sealapex' extract caused a similar effect in the tested concentration range. At the highest concentration (1:20), AH Plus had the higher inhibitory effect at days 14 and 21 (~84% and ~90%), followed by Tubliseal (~80% at both days), GuttaFlow (~67% and ~56%), RealSeal (~71% and ~45%) and Sealapex (~54% and ~21%), respectively. The effect of the sealers' extracts in the number of TRAP-positive multinucleated cells followed a pattern similar to that observed in TRAP activity (Fig.1B).

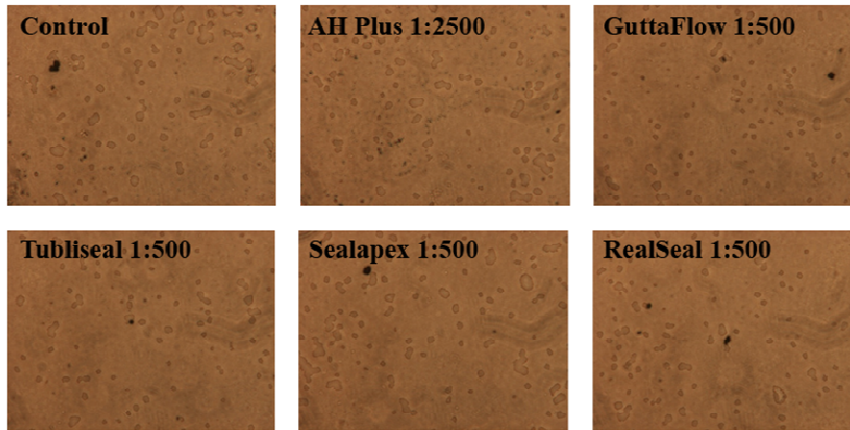


**Figure 1.** TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells of co-cultures performed in the presence of different elutions of root canal sealers extracts.

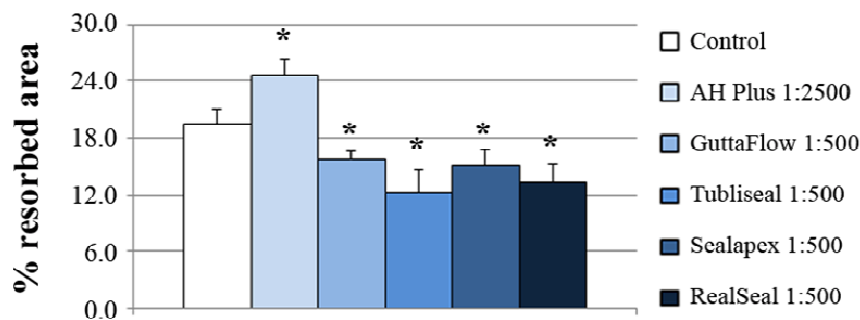
Co-cultures exposed to AH Plus (1:2500) and to the other sealers (1:500) were further characterized, at day 21, for calcium phosphate resorbing ability (Fig. 2A,B) and expression of osteoclastic-related genes (Fig. 2C). Control cultures displayed the presence of resorption lacunae, with a resorbed area around 20%. Comparatively, AH Plus caused a small increase (~27%), and all the other sealers elicited an inhibitory effect, with inhibition values of 17% (GuttaFlow), 20% (Sealapex), 29% (RealSeal) and 35% (Tubliseal). Co-cultures expressed the osteoclastic genes *c-myc*, *s-src*, TRAP, CATK and CA2. AH Plus caused a slight increase in the expression of these genes, and

the other sealers caused an inhibition. In both, statistical significance was achieved for all the genes except CA2.

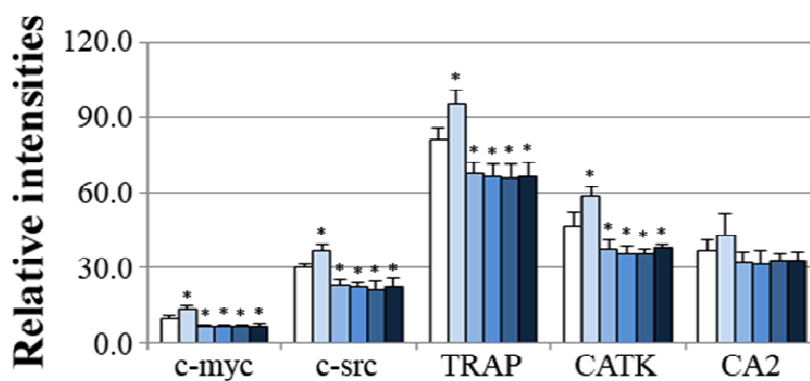
A



B



C



**Figure 2.** Calcium phosphate resorbing ability of co-cultures exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on TRAP activity, compared to control (AH 1:2500; GF, RS, S e T 1:500). After 21 days culture time over calcium phosphate layers, resorption lacunae were identified (A) and total resorbed area was quantified (B). RT-PCR analysis of co-cultures exposed to the lowest extract concentration that caused statistically significant differences on TRAP activity, compared to control (AH 1:2500; GF, RS, S e T 1:500). RT-PCR products were subjected to a densitometric analysis and were normalized to the corresponding GAPDH value (C).

## 3.1.1. Osteoclastogenic intracellular mechanisms

In control conditions, U0126, GO6983 and PD98,059 caused a decrease on TRAP activity at day 14, but this inhibitory effect was not observed at day 21 (Table 3). PDTC, SP600125, SB202190 and indomethacin elicited a significant decrease on cellular response, which was almost total in the presence of PDTC (at day 21). Comparatively, the inhibition elicited by U0126 was higher in the presence of all the sealers, except in the case of Sealapex. A decrease on PDTC-induced inhibition was observed in all tested conditions, while an opposite situation occurred in the case of GO6983, SP600125 and PD98,059. SB202190 inhibitory profile was decreased by all the sealers, except for AHPlus, which did not significantly affect it. Finally, indomethacin inhibition was lower in PBMC cultures treated with AH Plus and Sealapex, identical in those supplemented with Tubliseal and RealSeal and higher following treatment with GuttaFlow. Globally, the results obtained for the number of TRAP-positive multinucleated cells (data not shown) were in line with those seen for TRAP activity.

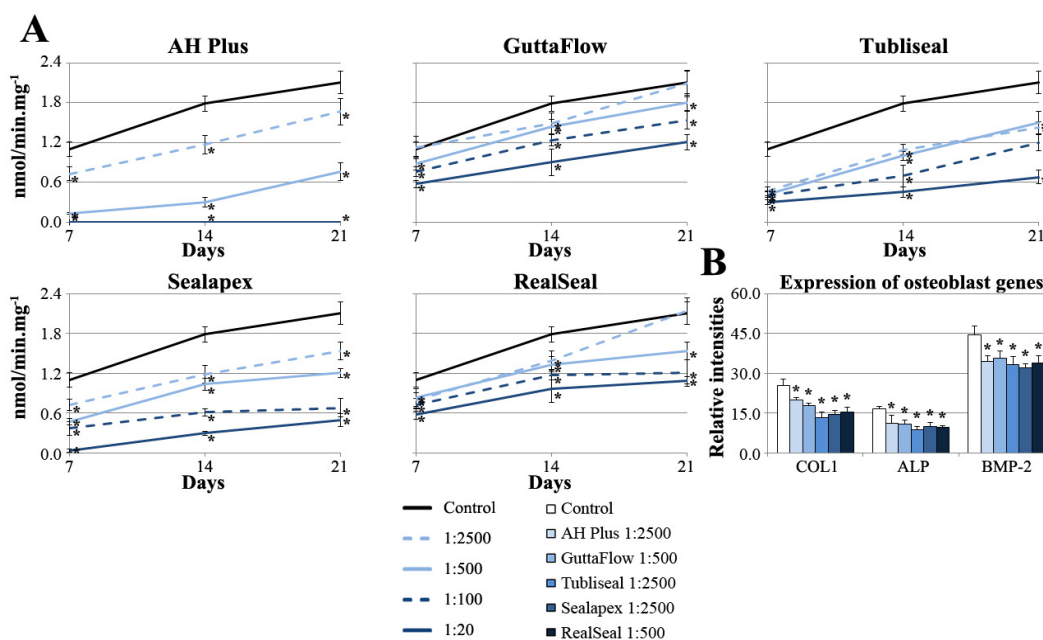
Inhibitor (Pathway)		% of inhibition					
		Control	AHPlus 1-500	GuttaFlow 1-500	Tubliseal 1-500	Sealapex 1-500	RealSeal 1-500
U0126 1 $\mu$ M (MEK)	D14	2.4 $\pm$ 0.9	69.5 $\pm$ 4.8 (*)	49.7 $\pm$ 7.1 (*)	44.4 $\pm$ 4.5 (*)	0.0 (*)	15.0 $\pm$ 2.4 (*)
	D21	0.0	65.7 $\pm$ 4.1 (*)	30.5 $\pm$ 5.4 (*)	35.2 $\pm$ 3.2 (*)	0.0	9.7 $\pm$ 0.4 (*)
PDTC 10 $\mu$ M (NFkB)	D14	63.0 $\pm$ 7.9	90.4 $\pm$ 2.6 (*)	72.4 $\pm$ 4.3	5.1 $\pm$ 0.6 (*)	52.6 $\pm$ 3.2 (*)	59.0 $\pm$ 5.5 (*)
	D21	91.6 $\pm$ 4.4	77.9 $\pm$ 4.3 (*)	77.3 $\pm$ 3.5 (*)	16.7 $\pm$ 1.9 (*)	46.0 $\pm$ 3.3 (*)	43.1 $\pm$ 3.3 (*)
GO6983 5 $\mu$ M (PKC)	D14	34.2 $\pm$ 3.7	79.3 $\pm$ 7.2 (*)	72.3 $\pm$ 6.3 (*)	22.2 $\pm$ 2.9 (*)	27.2 $\pm$ 2.3 (*)	56.1 $\pm$ 6.0 (*)
	D21	1.9 $\pm$ 0.2	33.6 $\pm$ 6.7 (*)	65.2 $\pm$ 4.5 (*)	40.3 $\pm$ 5.0 (*)	29.2 $\pm$ 3.2 (*)	62.3 $\pm$ 2.3 (*)
SP600125 10 $\mu$ M (JNK)	D14	11.1 $\pm$ 1.6	92.2 $\pm$ 7.2 (*)	91.9 $\pm$ 2.1 (*)	53.1 $\pm$ 4.2 (*)	67.9 $\pm$ 4.2 (*)	23.4 $\pm$ 7.2 (*)
	D21	11.0 $\pm$ 1.4	92.9 $\pm$ 7.1 (*)	92.0 $\pm$ 6.7 (*)	50.5 $\pm$ 4.7 (*)	71.0 $\pm$ 2.0 (*)	76.9 $\pm$ 2.0 (*)
SB202190 5 $\mu$ M (p38)	D14	39.5 $\pm$ 2.2	55.2 $\pm$ 4.2 (*)	43.3 $\pm$ 4.6	40.0 $\pm$ 3.2	31.2 $\pm$ 5.1 (*)	39.2 $\pm$ 5.3
	D21	41.4 $\pm$ 5.2	49.9 $\pm$ 6	30.2 $\pm$ 4.5 (*)	21.2 $\pm$ 1.5 (*)	3.2 $\pm$ 0.4 (*)	0.0 (*)
PD98059 10 $\mu$ M (MAPKK)	D14	12.1 $\pm$ 2.3	60.2 $\pm$ 7.5 (*)	73.6 $\pm$ 7.0 (*)	73.2 $\pm$ 4.4 (*)	27.5 $\pm$ 5.0 (*)	56.0 $\pm$ 7.6 (*)
	D21	0.0	73.2 $\pm$ 5.2 (*)	57.4 $\pm$ 4.4 (*)	54.4 $\pm$ 5.0 (*)	27.6 $\pm$ 3.9 (*)	45.2 $\pm$ 4.6 (*)
Indomethacin 1 $\mu$ M (COX2)	D14	4.2 $\pm$ 0.5	19.0 $\pm$ 2.1 (*)	50.2 $\pm$ 6.1 (*)	19.5 $\pm$ 2.2 (*)	5.0 $\pm$ 0.4	22.4 $\pm$ 4.5 (*)
	D21	21.7 $\pm$ 2.2	9.6 $\pm$ 1.0 (*)	32.5 $\pm$ 4.6 (*)	21.6 $\pm$ 4.2	0.0 (*)	20.4 $\pm$ 1.7

Table 3. Involvement of osteoclastogenic-related mechanisms (MEK, NFkB, PKC, JNK, p38 and MAPKK signaling pathways, and PGE2 production) on co-cultures exposed to the sealers' extracts. (\*) Significantly different from the control.

### 3.2. Osteoblastic response

In control co-cultures, ALP activity increased mostly until day 14 and tended to stabilize afterwards. All the extracts caused a dose-dependent inhibition on the enzyme activity. Mostly, the inhibitory effect appeared more relevant until day 14, and, during the last week, the percentage of inhibition decreased. For GuttaFlow and RealSeal, in the cultures exposed to the lower concentration (1:2500), ALP activity at day 21 was similar to that on control. The lower concentration that caused statistical significant inhibition was 1:2500 for AH Plus, Tubliseal and Sealapex and 1:500 for GuttaFlow and RealSeal. In the cultures exposed to the higher extract' concentration (1:20), the percentages of inhibition at day 21 were 43% (GuttaFlow), 48% (RealSeal), 66% (Tubliseal), 75% (Sealapex) and 100% (AH Plus).

Co-cultures exposed to AH Plus, Tubliseal and Sealapex (1:2500) and GuttaFlow and RealSeal (1:500) presented significant decreased gene expression of COL 1, ALP and BMP-2, compared to control cultures. The results were in line with those observed for ALP activity.



**Figure 3.** ALP activity (a) and expression of osteoblastic-associated genes (b) on co-cultures exposed to the sealers' extracts. (\*) Significantly different from the control.

### 3.2.1 Osteoblastic intracellular mechanisms

Control co-cultures were significantly affected by all the tested inhibitors, with a decrease on ALP activity particularly accentuated following treatment with U0126 and KN-93 (Table 4). All the sealers elicited a decrease on the inhibition caused by U0126, except GuttaFlow. SP600125 inhibitory profile was increased by AHPlus (at day 21), GuttaFlow and RealSeal (at day 14), but decreased in the presence of the remaining sealers. The inhibition elicited by IWR-1 remained identical in the presence of AHPlus (at day 21) and Sealapex, and was higher with GuttaFlow, Tubliseal and RealSeal. Finally, KN-93 caused a lower inhibition in all tested conditions, except in the case of RealSeal.

Inhibitor (Pathway)		% of inhibition					
		Control	AHPlus 1:2500	GuttaFlow 1:500	Tubliseal 1:2500	Sealapex 1:2500	RealSeal 1:500
U0126 1 $\mu$ M (MEK)	D14	59.2 $\pm$ 5.6	6.6 $\pm$ 0.6 (*)	54.8 $\pm$ 4.5	19.2 $\pm$ 1.3 (*)	62.1 $\pm$ 2.7	13.1 $\pm$ 2.2 (*)
	D21	51.6 $\pm$ 4.0	32.6 $\pm$ 4.5 (*)	47.7 $\pm$ 3.3	21.9 $\pm$ 2.3 (*)	55.8 $\pm$ 4.5	10.8 $\pm$ 1.8 (*)
SP600125 10 $\mu$ M (JNK)	D14	35.4 $\pm$ 3.1	36.3 $\pm$ 4.7	65.7 $\pm$ 5.6 (*)	37.0 $\pm$ 3.0	26.6 $\pm$ 1.4 (*)	51.2 $\pm$ 7.2 (*)
	D21	33.2 $\pm$ 5.6	60.0 $\pm$ 5.6 (*)	64.5 $\pm$ 5.1 (*)	13.9 $\pm$ 1.7 (*)	28.1 $\pm$ 2.2 (*)	35.4 $\pm$ 4.5
IWR-1 10 $\mu$ M (canonical Wnt/ $\beta$ - catenin)	D14	12.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 0.3 (*)	45.1 $\pm$ 3.6 (*)	52.6 $\pm$ 7.3 (*)	11.8 $\pm$ 1.1	37.0 $\pm$ 5.6 (*)
	D21	18.6 $\pm$ 3.9	18.0 $\pm$ 1.2	56.6 $\pm$ 4.1 (*)	40.8 $\pm$ 3.4 (*)	12.2 $\pm$ 4.2	30.0 $\pm$ 5.5 (*)
KN-93 10 $\mu$ M (CaMKII)	D14	67.0 $\pm$ 7.8	33.41 $\pm$ 4.8 (*)	39.44 $\pm$ 4.5 (*)	62.8 $\pm$ 5.6	16.4 $\pm$ 1.6 (*)	64.3 $\pm$ 6.2
	D21	67.5 $\pm$ 6.7	27.8 $\pm$ 3.3 (*)	21.3 $\pm$ 3.8 (*)	47.1 $\pm$ 2.4 (*)	21.6 $\pm$ 1.1 (*)	55.9 $\pm$ 6.2

Table 4. Involvement of osteoblastogenic-related mechanisms (MEK, JNK, canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and CaMKII) on co-cultures treated with the sealers' extracts. (\*) Significantly different from the control.

## 4. Discussion

In the bone microenvironment, the reciprocal osteoblast-osteoclast communication and the corresponding coordinated bone formation and resorption events are highly complex and regulated processes, responsible for the life-long bone remodeling in order to ensure a healthy tissue formation and maintenance<sup>14</sup>. Thus, in this work, co-cultures of human osteoblastic and osteoclastic cells were used as an *in vitro* model to address the dose- and time-dependent effects of endodontic sealers' extracts in bone cells. The extracts were obtained by incubating the freshly mixed material with culture medium, as, clinically, the sealers are applied in this form, and the unset material might contact with

apical and periapical tissues. The sealers' surface/medium rate was 1.3cm<sup>2</sup>/ml, which is in agreement to ISO Standards 10993-5 for the testing of dental materials.

It is known that osteoblasts synthesize a variety of molecules important in the recruitment and survival of osteoclast precursors and also engaged with the later steps of osteoclastogenesis, namely M-CSF and RANKL, which are sufficient to promote *in vitro* osteoclastogenesis<sup>13</sup>. Also, some factors produced by osteoclasts seem to stimulate osteogenesis<sup>14</sup>. In the present work, the protocol used allowed the establishment of co-cultures of osteoclastic and osteoblastic cells displaying phenotype features of both cell types, in the absence of any exogenous differentiation factors, as observed previously<sup>16,19</sup>. Osteoclast parameters included a high TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells, expression of osteoclastic-related genes and calcium phosphate resorbing ability. Co-cultures also showed high ALP levels and gene expression of ALP, COL 1 and BMP-2, which are typical osteoblastic markers<sup>13</sup>. The differentiation of osteoclastic and osteoblastic cells was evident by the progressive increase in TRAP and ALP activities, respectively, which occurred mostly during the two first weeks; values stabilized in the last week, suggesting that differentiated/mature osteoclasts and osteoblasts were present from day 14 onwards. Thus, this co-culture system appeared as a useful model to analyze the effects of endodontic sealers in interacting osteoclastic and osteoblastic cells.

The results on TRAP and ALP activities observed in the co-cultures showed that the sealers' extracts caused dose-dependent inhibitory effects on osteoclastic and osteoblastic behavior. The only exception was the low stimulatory effect on TRAP activity seen in the presence of the lowest concentration of AH Plus, reflecting most probably an adaptive cell response to cope with the presence of toxic compounds. Differences were noted for the effects on the two cell types, and also on the profile of each sealer. Regarding TRAP activity and number of TRAP-positive multinucleated cells, inhibition was mainly observed during the two first weeks, i.e. during osteoclastic differentiation<sup>13,23</sup>; afterwards, values stabilized (as for GuttaFlow) or increased (as for the other sealers). The lower concentration to cause inhibitory effects was 1:100 for AH Plus and 1:500 for the other sealers. Evident dose-dependent inhibitory effects were observed for AH Plus, GuttaFlow, Tubliseal and RealSeal, but Sealapex caused a similar inhibition in the tested concentration range (1:2500 - 1:20) and cells recovered almost completely from the initial deleterious effects. Compared to the osteoclastic cells, osteoblastic cells appeared more sensitive to the toxic effects of the sealers. This is

suggested by the results regarding the lower concentration that caused statistical significant decrease on ALP activity (i.e. 1:2500 for AH Plus, Tubliseal and Sealapex) and also by lower ability to recover from the inflicted initial toxicity. The later observation was especially evident for AH Plus (in which the two higher concentrations were lethal) and Sealapex (that caused dose-dependent inhibition in the tested concentration range). As observed for the osteoclastic behavior, inhibition on ALP activity occurred mainly during the first two weeks, i.e during the osteoblastic differentiation<sup>13,18</sup>.

In the clinical setting, the contact of the endodontic sealer with the apical and periapical tissues involves a small area; in addition, the potential leachable cytotoxic compounds are continually cleared by the extracellular fluids, suggesting the presence of low local levels after the initial contact. Thus, in predicting the long-term effects of the sealers, exposure of bone cells to low concentrations of the sealers' extracts appears to be a more representative situation. Thus, co-cultures exposed to the lowest tested concentrations that elicited statistically significant effects on TRAP and ALP activities were further characterized for other phenotype parameters. Regarding the osteoclastic behavior, the extracts affected the expression of the differentiation and activation genes *c-myc* and *c-src* and the functional genes TRAP and CATK, and the calcium phosphate resorbing activity. The sealers also decreased the expression of the osteoblastic genes COL 1, ALP and BMP-2. The results were in line with those observed for TRAP and ALP activities, respectively.

Osteoclast and osteoblast differentiation are complex processes that involve multiple overlapping intracellular mechanisms that, at the end, direct the precursors or the immature cells towards the formation of mature and functional bone cells<sup>20,22</sup>. In this context, co-cultures were further characterized for the involvement of several signalling pathways on the observed cellular responses. It is important to note that although very important, none of them is exclusive of osteoclastogenesis or osteoblastogenesis, and two of the analyzed pathways (MEK and JNK) have an important role in both processes. The sealers differed significantly on the relative contribution of the signalling pathways, which might be related with the different nature of the toxic compounds associated with each sealer' toxicity. Some differences were particularly evident. In the case of the osteoclastogenic response, MEK pathway appeared to be significantly up regulated following treatment with AHPlus, GuttaFlow and Tubliseal, while NFkB seemed to be less involved in the presence of Tubliseal, Sealapex and Realseal. All the



sealers elicited an increase on the involvement of PKC, JNK and MAPKK pathways. p38 pathway seemed to be down regulated by Sealapex and RealSeal. Finally, PGE2 production had no significant contribution in PBMC cultures supplemented with Sealapex. Regarding the osteoblastic response, MEK pathway had a little role in the presence of RealSeal. GuttaFlow and Tubliseal appeared to induce an up regulation of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, while  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II appeared to be down regulated by AHPlus, GuttaFlow and Sealapex.

Many studies have reported on the cellular effects of endodontic sealers, but a great results discrepancy is observed regarding cytotoxicity patterns or the effects on a specific cell type, which is expected considering the variety of experimental conditions regarding the tested cell type (mainly fibroblasts), the preparation of the extracts, and the concentration range and time of exposure. GuttaFlow, a silicone-based sealer manufactured by adding gutta-percha powder to the silicone matrix (and containing nanosilver particles as a preservative) was previously tested in fibroblasts<sup>24,25,26,27,28</sup>; its toxicity might result from the release of nanosilver particles as they have been associated with dose-dependent cytotoxic effects<sup>1</sup>. It is also reported the presence of small voids within the core of GuttaFlow, which favor the release of unreacted compounds that accumulates in such pores<sup>29</sup>. Effects of AH Plus were evaluated in fibroblasts<sup>10,24-28,30,31,32</sup>, human periodontal ligament cells<sup>33</sup> and osteoblasts<sup>2,3,10,11</sup>. Most of these studies suggested that this epoxy resin-based sealer, apparently “formaldehyde-free”, exhibited a moderate to severe toxicity immediately after mixing (the conditions used in the present work), due to the release of low levels of formaldehyde, the presence of amines added to accelerate the epoxy polymerization and the epoxy resin content<sup>34,35</sup>. The toxicity of Tubliseal, a zinc oxide eugenol-based sealer has been attributed to free eugenol release, and also to several additives, namely the resins used for greater dentin adhesion<sup>1</sup>, and was demonstrated in fibroblasts<sup>28</sup> and human periodontal ligament cells<sup>36</sup>. Sealapex was tested in fibroblasts<sup>32,37</sup>, human periodontal ligament cells<sup>33,36</sup> and osteoblasts<sup>8,12</sup>, and its toxicity has been associated to an increase in the pH of the culture medium resulting from the sealer dissolution<sup>1,34,38</sup>. In the present work, the pH remained constant throughout the culture time, due to the low tested levels, and other components such as polyresin, zinc oxide and  $\text{Ba}^{2+}$  have been suggested as potential toxic compounds<sup>1</sup>. RealSeal is a dual-cured hydrophilic multi-methacrylate resin-based sealer, and its toxic effects were shown in fibroblasts<sup>10,24,26,31,34,37,39,40,41</sup>, human dental pulp cells<sup>41</sup> and osteoblasts<sup>7,9,10</sup>, and it is caused by the leaching of unreacted monomers

as a result of incomplete polymerization, and also to filler particles due to the degradation of the sealer.

Regarding bone cells, few studies were performed in osteoblastic cells involving the sealers studied in the present work. AH Plus was tested in human U2-OS osteosarcoma cells and authors reported that the activation of COX-2 expression<sup>2</sup> and IL-6 and IL-8 mRNA gene expression<sup>3</sup> might be contributing mechanisms in the toxicity of this sealer. Studies performed in the rat cell lines MC3T3-E1 and ROS 17/2.8 showed that the toxicity of AH Plus decreased with the aging of the sealer<sup>11</sup> and that these cell lines responded differently to this sealer<sup>10</sup>. Viability and apoptosis was analyzed in rat calvarial osteoblasts exposed to conditioned medium from Sealapex<sup>12</sup>. MC3T3-E1 cells were also exposed to Sealapex extracts, and authors suggested that oxidative stress is not involved in the cytotoxicity of this sealer<sup>8</sup>. Disks of RealSeal, after setting, were placed in direct contact with ROS 17/2.8 cells and for 5 succeeding weeks after immersion in simulated body fluid, and results showed that toxicity decreased gradually over time<sup>9</sup>. RealSeal extracts showed initial cytotoxicity effect on MG63 cells which disappeared after few days of culture<sup>7</sup>. Considering other sealers, a study performed with extracts of AH26, Canals and N2 showed an up-regulation on the expression RANKL in U2-OS cells<sup>5</sup>. As RANKL plays a critical role in osteoclastogenesis, authors suggested that this might be a contributing mechanism in the pathogenesis of periapical bone destruction induced by root canal sealers<sup>5</sup>. An indirect effect on osteoclastic activity might also be hypothesized in the studies referred above showing that AH Plus caused an induction on the expression of COX-2<sup>2</sup> and IL-6 and IL-8<sup>3</sup> in U2-OS cells, as these molecules might have a role in osteoclastic activity<sup>13</sup>. These studies suggest that toxicity of these sealers in the bone tissue might involve an alteration of the normal interaction between osteoblasts and osteoclasts in the bone microenvironment. However, to the best of our knowledge, the present study in the first to address the effects of endodontic sealers in osteoblastic and osteoclastic cells in a co-culture system.

## 5. Conclusion

Results of the present work showed that extracts from freshly mixed sealers caused mostly inhibitory effects in the osteoclastic and the osteoblastic behavior of co-cultures of human peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells. In co-

cultured cells, the sealers caused a dose-dependent decrease on TRAP and ALP activities, respectively an osteoclastic and an osteoblastic marker. The inhibitory effect was more significant during the two first weeks, the culture period mainly engaged with the osteoclastic and osteoblastic differentiation, in the experimental conditions used. Afterwards, adaptive cell responses were observed, as reflected by stabilization or increase on TRAP and ALP activities. Osteoblastic cells were more sensitive to the toxic effects of the sealers' extracts, compared to the osteoclastic cells, as suggested by the cytotoxic profile in the tested concentration range and the lower ability to recover from the initial deleterious effects. Other phenotype parameters, as the resorbing ability of the osteoclastic cells and the expression of osteoclastic and osteoblastic genes were also affected, and results were in line with those observed on TRAP and ALP activities. The sealers differed on the dose- and time-dependent profile in co-cultured osteoclastic and osteoblastic cells, and also in the modulation of intracellular signaling pathways important for osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. Although *in vivo*, a lower cytotoxicity is expected due to the continuous fluids flow and the presence of the extracellular matrix, the higher sensitivity of the osteoblastic cells and the better adaptive response of the osteoclastic cells, suggested in the present work, might disrupt the highly regulated interaction between these cell types, compromising the local bone metabolism.

## References

---

- <sup>1</sup>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; 36:147-60.
- <sup>2</sup>Huang FM, Chou MY and Chang YC. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression by epoxy resin and zinc oxide-eugenol based root canal sealers in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2003; 24: 1869-75.
- <sup>3</sup>Huang FM, Tsai C-H, Yang S-F, Chang Y-C. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod* 2005;31:679-683.
- <sup>4</sup>Huang FM, Yang S-F, Chang Y-C. Up-regulation of gelatinases and tissue type plasminogen activator by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod* 2008;34:291-4.
- <sup>5</sup>Huang FM, Lee SS, Yang SF, Chang YC. Up-regulation of receptor activator nuclear factor-kappaB ligand expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod* 2009;35:363-6.
- <sup>6</sup>Huang FM, Yang S-F, Chang Y-C. Effects of root canal sealers on alkaline phosphatase in human osteoblastic cells. *J Endod* 2010;36:1230-3.
- <sup>7</sup>Xu P et al. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast like MG63 cells. *J Endod* 2010;36:40- 44.
- <sup>8</sup>Lee DH et al. Mechanisms of root canal sealers cytotoxicity on osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:717- 21.
- <sup>9</sup>Ames JM et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod* 2009;35:225- 28.
- <sup>10</sup>Brackett MG et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mat Res B: Appl Biomater* 2010; 95B:380- 86.
- <sup>11</sup>Bryan TE et al. In vitro osteogenic potencial of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endod* 2010;36:1163-69.
- <sup>12</sup>Al-Awadhi S et al. Cultured primary osteoblasts viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod* 2004;30:527- 33.
- <sup>13</sup>Datta HK et al. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61:577-87.
- <sup>14</sup>Matsuo K, Irie N, Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 201-209.
- <sup>15</sup>Heinemann C et al. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterial testing. *Eur Cell Mater* 2011; 21: 80- 93.
- <sup>16</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. *J Cell Biochem* 2011;112:3704-13.
- <sup>17</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes MH. Paracrine-mediated differentiation and activation of human hematopoietic osteoclast precursor cells by skin and gingival fibroblasts. *Cell Prolifer* 2011; 44: 264-73.
- <sup>18</sup>Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, b-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000; 21: 1095-1102.
- <sup>19</sup>Costa-Rodrigues J et al. Hydroxyapatite surface roughness: Complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. *Acta Biomaterials* 2012; 8:1137-45.

- 
- <sup>20</sup>Zhao Q et al. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007; 12, 2519–2529.
- <sup>21</sup>Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 2008;473: 32–8.
- <sup>22</sup>Lian JB et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7: 1-16.
- <sup>23</sup>Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14+ and CD14- cell fractions. *Cell Prolifer* 2011; 44: 410-419.
- <sup>24</sup>Bouillaguet S et al. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod* 2006;32: 989- 92.
- <sup>25</sup>Eldeniz AU et al. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide-, and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingival and L929 cell lines. *Int Endod J* 2007; 40: 329- 37.
- <sup>26</sup>Brackett MG et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endod J* 2008; 41: 1072- 78.
- <sup>27</sup>Willershausen I et al. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & Face Med* 2011; 7: 15.
- <sup>28</sup>Zoufan K et al. Cytotoxicity evaluation of GuttaFlow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112:657-61.
- <sup>29</sup>Elayouti A et al. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endod* 2005; 31: 687-90.
- <sup>30</sup>Miletić I et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus Compared during different setting periods. *J Endod* 2005; 31: 307- 9.
- <sup>31</sup>Lodienè G et al. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2008; 41: 72-7.
- <sup>32</sup>Silva EJ et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J* 2012; 45: 49- 56.
- <sup>33</sup>Huang FM et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35:153- 8.
- <sup>34</sup>Eldeniz AU et al. Evaluation of pH and ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 103: e86- e91.
- <sup>35</sup>Merdad K et al. Short term cytotoxicity assesment of components of the Epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct Millipore filter assays. *J Endod* 2007; 33: 24- 7.
- <sup>36</sup>Chang MC et al Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblast. *Int Endod J* 2010; 43: 251- 7.
- <sup>37</sup>Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2006; 32: 756- 8.
- <sup>38</sup>Duarte MA et al. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *J Endod* 2000; 26: 389- 90.
- <sup>39</sup>Susini G et al. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int End J* 2006; 39: 940- 44.

---

<sup>40</sup>Donadio M et al. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: e74- e78.

<sup>41</sup>Karapinar-Kazandağ M et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J* 2011; 44: 626- 34.

# **DISCUSSÃO**





Este estudo avaliou a citotoxicidade *in vitro* de cinco cimentos de obturação, com diferentes composições (GuttaFlow®, AH Plus®, Sealapex®, Tubliseal® e RealSeal®), no comportamento de células osteoblásticas, células osteoclásticas e co-culturas de células osteoclásticas e osteoblásticas.

Langland et al em 1969<sup>1</sup> e Browne em 1988<sup>2</sup> questionaram a relevância clínica da utilização de culturas celulares para avaliar a toxicidade dos cimentos de obturação. Segundo estes autores, a superfície de contacto e a forma do material exposto às células de cultura deveria ser o mais aproximado possível da situação clínica, pois se a superfície de contacto for muito grande, qualquer material apresenta citotoxicidade *in vitro*. Por este motivo, o primeiro estudo teve como objectivo avaliar o comportamento das células osteoblásticas MG63 na presença de extratos dos vários cimentos de obturação preparados de duas formas distintas: norma ISO 10993-5 e “root-dipping”. Como seria de esperar, os extratos preparados de acordo com a norma ISO provocaram efeitos tóxicos mais significativos. Nesta metodologia, a área de contacto entre o cimento e as células ou o meio de cultura a partir do qual se preparam os extratos é normalmente grande. No entanto, o contacto direto entre o material de obturação e os tecidos periapicais é muito menor, e as interações indiretas resultantes da difusão ou perfusão dos seus componentes ou sub-produtos da polimerização são limitadas ao foramen apical, aos canais laterais/ acessórios ou aos túbulos dentinários<sup>3,4,5</sup>. O foramen apical, que é a principal interface entre o material de obturação e o ligamento periodontal (num dente submetido a tratamento endodôntico), tem, em média, 400 µm de diâmetro (antes da instrumentação)<sup>6</sup>. Por outro lado, há o risco de extravazamento de material, especialmente quando existem lesões periapicais que provocam reabsorção do ápice, alterando a anatomia radicular. Nestes casos, a área de contacto entre o cimento e as células e a concentração de substâncias potencialmente tóxicas nas células aumentam substancialmente<sup>7</sup>.

Neste estudo, a citotoxicidade variou com a concentração dos extratos e com o tempo de exposição. No entanto, *in vivo*, as substâncias podem ser eliminadas pelo hospedeiro, resultando numa menor reação inflamatória local<sup>8</sup>. É, portanto, necessário ter algum cuidado na interpretação dos resultados. A caracterização da biocompatibilidade de cimento deve ser o resultado cumulativo de estudos *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos.

Num estudo recente, Brackett e colaboradores<sup>9</sup> sugerem que a avaliação dos cimentos *in vitro* deve incluir mais que um tipo celular. Neste trabalho avaliou-se o efeito de extratos de cimentos de obturação em células osteoblásticas MG63, células osteoclásticas e co-culturas de células osteoblásticas e osteoclásticas. As co-culturas de osteoblastos e osteoclastos começaram por ser utilizadas para estudar a relação entre os dois tipos celulares e a importância do RANKL na diferenciação dos osteoclastos. No entanto, este conhecimento começou a ser aproveitado para outras aplicações práticas, nomeadamente a utilização deste tipo de co-cultura em estudos de biocompatibilidade de materiais.

Os cimentos de obturação utilizados neste estudo foram colocados em contacto com o meio de cultura imediatamente após a mistura, uma vez que é o que acontece na situação clínica – o cimento é colocado no interior do canal imediatamente após a sua espatulação. Antes da polimerização completa, os cimentos podem libertar sub-produtos citotóxicos que provocam irritação tecidual. As reações de polimerização podem causar a degradação de alguns químicos ou produzir novas combinações que não estavam presentes nas formulações originais.

Os cimentos à base de óxido de zinco eugenol são amplamente utilizados há muitos anos, mas libertam eugenol. A libertação do eugenol por hidrólise é uma causa demonstrada de toxicidade *in vitro*<sup>10,11,12,13</sup> e *in vivo*<sup>14,15,16</sup>. A libertação de eugenol parece, no entanto, diminuir com o tempo, devido à progressiva hidrólise da superfície do cimento<sup>17</sup>, pelo que a toxicidade dos cimentos diminui ao longo do tempo, proporcionalmente à concentração de eugenol<sup>18</sup>. Parece, no entanto, que outros componentes dos cimentos à base de óxido de zinco eugenol, como iões zinco ( $Zn^{2+}$ ) ou óxido de zinco (ZnO), podem influenciar a sua toxicidade<sup>19,20</sup>.

O Tubliseal, cimento à base de óxido de zinco eugenol utilizado neste trabalho, apresenta na sua constituição, e segundo o fabricante, 14% de uma resina oleosa. Alguns componentes das resinas oleosas extraídas de plantas mostraram efeito antibacteriano e promoveram a cicatrização de feridas<sup>21,22</sup>, mas também demonstraram ser potencialmente citotóxicos<sup>23</sup>. A citotoxicidade do Tubliseal pode também ser causada pelo seu teor de eugenol, no entanto a contribuição do iodeto de timol, resinas oleosas e outros componentes do cimento necessita de mais investigação<sup>24</sup>. O Tubliseal

contém resinas, adicionadas para aumentar a adesão à dentina, que também podem contribuir para a toxicidade<sup>25</sup>.

Alguns cimentos contêm “rosin”, um derivado de resinas oleosas de coníferas para aumentar a adesividade e influenciar o tempo de polimerização através de uma reação com o óxido de zinco<sup>26</sup>. A adição deste derivado resinoso ao pó de óxido de zinco reduz a solubilidade e a desintegração do cimento. A principal função do óxido de zinco é modificar as propriedades adesivas e reforçar e promover a polimerização do material<sup>27</sup>. Nos cimentos, após a polimerização, o óxido de zinco fica em parte ligado quimicamente, enquanto na guta-percha faz parte da mistura química<sup>28</sup>.

A “rosin” é constituída por aproximadamente 60-70% de resinas ácidas e 30-40% de compostos voláteis e não voláteis, como terpeno, álcool, aldeídos e hidrocarbonatos. A composição química das “rosins” comerciais tem uma grande variabilidade e afeta a sua toxicidade. As diferenças nas propriedades físicas e químicas das resinas oleosas podem influenciar a sua libertação do cimento e a sua interação com outros agentes tóxicos, nomeadamente o eugenol e compostos fenólicos. Contudo, o zinco parece ter um efeito inibitório nos efeitos tóxicos das resinas oleosas e resinas ácidas<sup>29</sup>.

O Sealapex foi um dos primeiros cimentos de obturação endodôntico com hidróxido de cálcio, disponível comercialmente. Os cimentos à base de hidróxido de cálcio promovem calcificação, mas tendem a dissolver ao longo do tempo, comprometendo o selamento<sup>30</sup>. O elevado pH inicial do hidróxido de cálcio, devido à libertação de iões hidróxido, ainda que tenha efeitos benéficos, como a formação de tecido mineralizado<sup>31,32,33</sup> e efeito bactericida<sup>34</sup>, parece também ser responsável por algum efeito tóxico<sup>35, 36, 37, 38, 39</sup>. O elevado pH pode ainda interferir com a atividade osteoclástica<sup>40</sup> e promover a cicatrização<sup>41</sup>. A libertação de iões cálcio é também uma característica importante dos cimentos à base de hidróxido de cálcio, uma vez que estes iões podem promover a mineralização e são necessários à migração e diferenciação celular<sup>31,42</sup>. Estudos da toxicologia do hidróxido de cálcio indicaram que esta substância pode causar destruição das membranas celulares, bem como degeneração e desintegração celular<sup>43,44</sup>. Takahara e colaboradores<sup>45</sup> atribuíram a toxicidade do Sealapex a outros componentes do cimento, como as poliresinas, o óxido de zinco e o ião Ba<sup>++</sup>. Um estudo mais recente de Chang e colaboradores<sup>46</sup> confirma estes resultados.

O cimento AH Plus é o sucessor do cimento AH26, com a vantagem de, segundo o fabricante, não libertar formaldeído durante a reação de polimerização. No entanto, vários estudos referem que o AH Plus liberta uma pequena quantidade de formaldeído<sup>47, 48,49</sup>. A toxicidade do AH26 pode estar relacionada com outros constituintes do material, além do formaldeído, como aminas ou resinas. Schweikl e colaboradores<sup>50</sup> atribuíram a citotoxicidade do AH26 à resina epoxi bisfenol, que também está presente na constituição do AH Plus, justificando assim a sua toxicidade<sup>47,49, 51</sup>. As aminas, presentes para acelerar a polimerização também podem ser causa de toxicidade<sup>52</sup>. Em resumo, a toxicidade inicial do AH Plus pode ser atribuída à libertação de uma pequena quantidade de formaldeído, às aminas adicionadas para acelerar a polimerização ou à resina epoxi.

O AH Plus tem uma composição química complexa, pelo que são várias as substâncias que podem libertar-se durante a reação de polimerização e causar efeito tóxico. É um sistema de duas pastas, cuja polimerização resulta da reação resina epoxi-aminas.

Este cimento tem efeito antibacteriano, o que também pode originar efeito tóxico<sup>53</sup>.

O tungestato de cálcio, presente na constituição do AH Plus, é muito utilizado para aumentar a radiopacidade dos cimentos de obturação<sup>54</sup>.

A presença de porosidades nos cimentos espatulados à mão (como é o caso do AH Plus) pode favorecer a libertação de componentes que não reagem quimicamente, os quais podem ser responsáveis por alguma toxicidade<sup>55</sup>.

O RealSeal é um cimento à base de resina de metacrilato, de última geração, que utiliza cones de Resilon em substituição da guta-percha e cuja principal vantagem parece ser a adesão química ao cone e às paredes da dentina, originando assim um “monobloco”. O cimento de metacrilato necessita da temperatura corporal e de total ausência de ar para polimerizar. Polimeriza em 30 minutos num ambiente anaeróbio, mas na presença de ar demora muito mais tempo, e permanece uma camada superficial por polimerizar. Este facto influencia significativamente as propriedades biológicas do material e tem sido associado à sua toxicidade<sup>48</sup>.

A toxicidade dos cimentos de resina pode dever-se à presença de monómeros hidrofílicos não polimerizados (BisGMA, UDMA, EBPADMA e trietilenoglicol-dimetacrilato)<sup>56,57,58,59,60</sup>. A extrusão deste material para além do foramen apical poderá

originar uma camada não polimerizada durante longos períodos de tempo<sup>61,62</sup>. Outra causa de toxicidade pode ser a libertação de partículas por degradação do material ao longo do tempo<sup>63</sup>.

O RealSeal tem na sua constituição hidróxido de cálcio, originando um aumento do pH no meio circundante, o que pode favorecer o processo reparativo<sup>42</sup>, tal como acontece com os cimentos à base de hidróxido de cálcio. No entanto, é lógico pensar que se este factor é apontado como causa de toxicidade nos cimentos de hidróxido de cálcio, também o poderá ser para os cimentos de metacrilato, ainda que não haja estudos a comprova-lo.

O GuttaFlow é um cimento à base de silicone, apresentado na forma de cápsulas unidose e é injetado após a mistura (num vibrador de amálgama). Contem pó de guta-percha e nanopartículas de prata como conservante. O pó de guta-percha pode ter efeito irritante nos tecidos<sup>64</sup> e a prata demonstrou alguma toxicidade<sup>65,66</sup>. No entanto, este tipo de cimento mostra baixa toxicidade, antes e depois da polimerização<sup>67,68</sup>. É possível, porém, que haja libertação de componentes não polimerizados em porosidades do cimento<sup>69</sup>.

Relativamente à resposta aguda em culturas celulares osteoblásticas, o GuttaFlow foi o menos citotóxico, verificando-se mesmo uma recuperação do crescimento celular no dia 3, na técnica “root-dipping”, atingindo valores semelhantes ao controlo. O RealSeal (técnica ISO), o Sealapex, Tubliseal e RealSeal (técnica “root dipping”), originaram uma pequena estimulação das culturas celulares ao dia 1, o que pode traduzir uma resposta celular adaptativa à agressão, no entanto os efeitos tóxicos foram cumulativos, uma vez que a inibição do crescimento celular foi maior no dia 3.

Quanto à resposta a longo prazo, nas mesmas culturas celulares, verificou-se que todos os cimentos afetaram significativamente a viabilidade/proliferação celular e a atividade enzimática da ALP, quando se utilizou a técnica ISO. Com a técnica “root dipping”, apenas foi afetada a atividade enzimática da ALP. A ALP é uma enzima muito importante no metabolismo ósseo, uma vez que hidrolisa fosfatos orgânicos a iões fosfato, que com os iões cálcio, são utilizados na síntese da matriz óssea mineralizada.

As culturas celulares de osteoclastos foram significativamente afetadas pela presença dos extratos dos cimentos. Todos os cimentos exibiram efeitos tóxicos dependentes da

dose e do tempo de exposição, no entanto verificaram-se diferenças entre os cimentos. O AHPlus (nas duas concentrações mais altas), o GuttaFlow e o Tubliseal inibiram a atividade da TRAP nas duas primeiras semanas, mas o efeito estabilizou depois desse período. O Sealapex e o RealSeal provocaram também inibição até ao dia 14, no entanto as células recuperaram parcial ou totalmente da agressão após esse período. Quanto aos parâmetros osteoclásticos, os extratos dos cimentos afetaram a diferenciação e ativação dos genes *c-myc*, *c-src*, TRAP e CATK, a presença de anéis de actina, e receptores para vitronectina e calcitonina e a atividade de reabsorção. Influenciaram ainda algumas das vias de sinalização osteoclastogénicas. De uma forma geral, os resultados obtidos até ao dia 14 refletem os efeitos agudos dos cimentos de obturação e traduzem-se por efeitos inibitórios dependentes da dose e do tempo. Os resultados obtidos no dia 21 podem ser interpretados como efeitos mais a longo prazo e evidenciam a resposta celular adaptativa à presença dos extratos dos cimentos.

Nas co-culturas de células osteoclásticas e osteoblásticas, foi possível analisar os efeitos dos cimentos de obturação endodônticos nas interações entre os dois tipos celulares. Foram analisados parâmetros osteoclásticos (atividade da TRAP e número de células multinucleadas TRAP-positivas, expressão de genes osteoclásticos e capacidade de reabsorção do fosfato de cálcio) e osteoblásticos (atividade da ALP e expressão dos genes da ALP, COL 1 e BMP-2), e ainda diversas vias de sinalização, ainda que nenhuma exclusiva da osteoclastogénese ou da osteoblastogénese.

Verificou-se um efeito inibitório dose e tempo dependente na atividade da TRAP e da ALP. Os resultados sugerem que as células osteoblásticas são mais sensíveis aos efeitos nocivos dos cimentos que as células osteoclásticas. Ainda assim, tal como no estudo anterior, os extratos dos cimentos afetaram alguns parâmetros osteoclásticos. Observaram-se também diferenças entre os cimentos. Foi evidente um efeito inibitório dependente da dose para o AHPlus, GuttaFlow, Tubliseal e RealSeal. O Sealapex não mostrou grande variação dose-dependente e as células conseguiram recuperar dos efeitos nocivos iniciais. Os resultados da expressão génica foram concordantes com estes resultados. Quanto às vias de sinalização, os cimentos diferiram significativamente entre si, o que pode dever-se à diversidade de compostos tóxicos responsáveis pela toxicidade de cada cimento.

A comparação dos resultados deste trabalho com outros estudos *in vitro* não é fácil, uma vez que os estudos apresentam uma grande variabilidade entre si, diferindo nos materiais utilizados, nas técnicas de avaliação, nas culturas celulares utilizadas, nos tempos de exposição e concentrações dos cimentos. Ainda que todos os cimentos utilizados neste trabalho já tenham sido objecto de estudos de biocompatibilidade, são poucos os que utilizam células ósseas e todos eles utilizam osteoblastos. Não se encontra na literatura referência aos efeitos dos cimentos em culturas celulares de osteoclastos ou em co-culturas de osteoblastos e osteoclastos. Uma vez que os cimentos de obturação podem contactar directamente o tecido ósseo da região periapical, parece lógico estudar os seus possíveis efeitos em todas as células ósseas e avaliar a sua influência no metabolismo ósseo.

A aplicabilidade dos modelos e dos resultados *in vitro* no comportamento clínico dos materiais é sempre uma questão central na avaliação da biocompatibilidade. Este trabalho não é exceção. Tentamos inserir algumas variáveis clinicamente relevantes, nomeadamente a utilização dos cimentos imediatamente após a mistura e a diluição dos extratos, no entanto, há sempre questões que só poderão ser esclarecidas com estudos clínicos controlados e a longo prazo.

## Bibliografia

---

- <sup>1</sup>Langland K et al. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg* 1969; 27: 522- 42.
- <sup>2</sup>Browne R. The in vitro assesement of the cytotoxicity of dental materials, does it have a role? *Int Endon J* 1988; 21: 50-8.
- <sup>3</sup>Schmalz G et al. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endodon* 2001; 27: 23–30.
- <sup>4</sup>Schwarze T et al. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endodon* 2002; 28: 784–6.
- <sup>5</sup>Susini G et al. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endodon J* 2006; 39: 940–4.
- <sup>6</sup>Kutler Y. Microscopic investigation of root apexes. *J Am Dent Assoc* 1955; 50: 544- 52.
- <sup>7</sup>Siqueira JF Jr. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *EndodonTopics* 2005; 10: 123–47.
- <sup>8</sup>Donadio M et al. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2009; 107: e74–8.
- <sup>9</sup>Brackett et al. Cytotoxicity responses of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Research* 2010; 95B: 380- 86.
- <sup>10</sup>Koulaouzidou E et al. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *End Dent Traumatol* 1998; 14: 182- 5.
- <sup>11</sup>Gulati N et al. Cytotoxicity of eugenol in sealers containing zinc oxide. *End Dent Traumatol* 1991; 7: 181- 85.
- <sup>12</sup>Abou H et al. Eugenol diffusion through dentin related to dentin hydraulic conductance. *Dent Mater* 1998; 14: 229-36.
- <sup>13</sup>Stea S et al. Mutagenic potential of root canal sealers: evaluation through Ames testing. *J Biomed Mater Res* 1994; 28:319- 28.
- <sup>14</sup>Persson G and Thilander H. Experimental studies of surgical packs. I. In vitro experiments on antimicrobial effects. II. Tissue reactions to various packs. *Odontol. Tidskr* 1968; 76:147-162.
- <sup>15</sup>Koch G, Magnussen B and Nyquist G. Contact allergy to medicaments and materials used in dentistry. II. Sensitivity to eugenol and colophony. *Odontol Revy* 1971; 22: 275-89.
- <sup>16</sup>Wetter L et al. Effects of zinc oxide in an occlusive, adhesive dressing on the granulation tissue formation. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1986; 20:165-72.
- <sup>17</sup>Becker RM, Hume WR, Wolinsky. Release of eugenol from mixture of zinc oxide and eugenol in vitro. *J Periodontol* 1983; 8: 71.
- <sup>18</sup>Abou Hashieh I, Pommel L, Camps J. Concentration of eugenol apically release from zinc oxide-based sealers. *J Endodon* 1999; 25: 713- 5.
- <sup>19</sup>Maseki T et al. Lack of correlation between the amount of eugenol release from zinc oxide-eugenol sealers and cytotoxicity of the sealer. *J Endodon* 1991; 17: 76-9.
- <sup>20</sup>Nakamura H et al. Study on the citotoxicity of root canal filling materials. *J Endodon* 1996; 14: 156- 60.



- 
- <sup>21</sup>Paiva LA, et al. Investigation on the wound healing of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research* 2004; 16, 737–9.
- <sup>22</sup>Rahman MM, Garvey M, Piddock LJ, Gibbons S. Antibacterial terpenes from the oleo-resin of *Commiphora molmol*. *Phytotherapy Research* 2008; 22, 1356–60.
- <sup>23</sup>Costa-Lotufo LV et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera landsdorffii* oleo-resin. *Toxicol* 2002; 40, 1231–4.
- <sup>24</sup>Chang et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endodon J* 2010; 43: 251- 57.
- <sup>25</sup>Hauman CHJ and Love RM. Biocompatibility of dental material used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root canal filling materials. *Int Endod J* 2003; 36: 147-60.
- <sup>26</sup>Grossman LI. The effect of pH of rosin on setting time of root canal cements. *J Endodon* 1982; 8: 326–27.
- <sup>27</sup>Grove G. How zinc oxide functions in rubber-based adhesives. *Adhesives Age* 1971; June: 39–42.
- <sup>28</sup>Moorer WR and Genet JM. Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to the zinc oxide component. *Oral Surg* 1982; 53: 508–17.
- <sup>29</sup>Sunzel et al. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclearleucocytes and human gingival fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 20-8.
- <sup>30</sup>Zmener O. Evaluation of the apical seal obtained with two calcium hydroxide based endodontic sealers. *Int Endod J* 1987;20: 87-90.
- <sup>31</sup>da Silva LA et al. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997;30:205-9.
- <sup>32</sup>Holland et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002; 28:173-6.
- <sup>33</sup>Eldeniz AU et al. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e86-91.
- <sup>34</sup>Hosoya N et al. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J Endod* 2001; 27: 343-6.
- <sup>35</sup>Ranade MP, Kamra AI. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic materials. *Endodontology* 2003;15: 7- 13.
- <sup>36</sup>Silva LAB et al. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endodon* 1997; 23:86-90.
- <sup>37</sup>Zmener O, Gigliemotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. *Endod Dent Traumatol* 1990;6: 66- 72.
- <sup>38</sup>Huang TH et al. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mat Scien* 2004; 15: 767- 71.
- <sup>39</sup>Beltes P et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endodon and Dent Traumatol* 1995; 11: 245-9.

- 
- <sup>40</sup>Tronstad L et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
- <sup>41</sup>Lengheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 1995;103:148-55.
- <sup>42</sup>Seux D et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1991;36:117-28.
- <sup>43</sup>Das S. Effect of certain dental materials on human pulp tissue culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:76-84.
- <sup>44</sup>Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968; 18: 443-67.
- <sup>45</sup>Takahara K, Onodera A, Matsumoto K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endodon Dent Traumatol* 1990; 6: 200- 7.
- <sup>46</sup>Chang MC et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultures human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endodon J* 2010; 43: 251- 57.
- <sup>47</sup>Cohen BI et al. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endodon* 2000; 26: 228-29.
- <sup>48</sup>Merdad et al. Short-term cytotoxicity assesment of components of the Epiphany resin-percha obturation system by indirect and direct contact millipore filter assay. *J Endodon* 2007; 33: 24- 27.
- <sup>49</sup>Leonardo MR et al. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 88: 221-25.
- <sup>50</sup>Schweickl H et al. Mutagenicity of AH26 in na in vitro mammalian cell mutation assay. *J Endodon* 1995; 21: 407- 10.
- <sup>51</sup>Huang TH et al. Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endodon* 2001; 27: 744- 48.
- <sup>52</sup>Zmener O et al. Sealing properties of a new epoxy resin-based root canal sealer. *Int Endodon J* 1997; 30: 332- 4.
- <sup>53</sup>Kayaoglu G et al. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endodon J* 2005; 38: 483- 8.
- <sup>54</sup>Gomes Cornellio AL et al. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endodon* 2011; 37. 203- 10.
- <sup>55</sup>Mutal L, Gani O. Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *Int Endodon J* 2005; 38: 690- 6.
- <sup>56</sup>Susini G et al. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with root model. *Int Endodon J* 2006; 39: 940- 44.
- <sup>57</sup>Hikage S et al. Cytotoxicity of dental resin monomers in the presence of S9 mix enzymes. *Dent Mater J* 1999; 18: 76-86.
- <sup>58</sup>Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mat Research. Part B: Applied Biomaterials* 2005; 74: 617-26.
- <sup>59</sup>Donnelly A et al. Water sorption and solubility of methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endodon* 2007; 33: 990-4.

- 
- <sup>60</sup>Kim YK et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endodon* 2010; 36: 383-99.
- <sup>61</sup>Bouillaguet S et al. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endodon* 2006; 32: 989- 92.
- <sup>62</sup>Nielsen BA et al. Setting times of Resilon and other sealers in aerobic and anaerobic environments. *J Endod* 2006;32:130–2.
- <sup>63</sup>Versiani MA et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endodon J* 2006; 39: 464–71.
- <sup>64</sup>Sjögren U, Sundqvist G, Nair PNR . Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcutaneously in guinea pigs. *Europ J Science* 1995;103: 313–21.
- <sup>65</sup>Zhang FQ, She WJ, Fu YF. Comparison of the cytotoxicity in vitro among six types of nano-silver base inorganic antibacterial agents. *Zhonghua Kou Giang Yi Xue Za Zhi* 2005; 40: 504–7.
- <sup>66</sup>Baker C et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nano particles. *J Nanosci Nanotechnol* 2005; 5: 244- 9.
- <sup>67</sup>Eldeniz AU et al Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endodon J* 2007; 40: 329- 37.
- <sup>68</sup>Zoufan K et al. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:675-61.
- <sup>69</sup>Elayouti A et al. Homogeneity and adaptation of new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endodon* 2005, 31: 687- 90.



# **CONCLUSÕES**



Com este trabalho *in vitro* avaliamos a citotoxicidade de cinco cimentos de obturação, com diferentes composições (GuttaFlow®, AH Plus®, Sealapex®, Tubliseal® e RealSeal®), no comportamento de diferentes tipos celulares: células osteoblásticas, células osteoclásticas e co-culturas de células osteoclásticas e osteoblásticas.

Os extratos preparados a partir dos cimentos endodônticos segundo a norma ISO 10993-5 e a técnica “root-dipping” originaram uma resposta aguda, com efeitos inibitórios na viabilidade/proliferação das células osteoblásticas MG63, dependentes da dose e do tempo de exposição. Relativamente à exposição prolongada a uma concentração baixa, os extratos preparados de acordo com a norma ISO causaram uma inibição significativa na viabilidade/proliferação celular e na atividade da fosfatase alcalina, enquanto os extratos preparados pela técnica “root-dipping” não afetaram a viabilidade/proliferação celular, mas inibiram parcialmente a atividade desta enzima. Os extratos preparados segundo a norma ISO causaram uma citotoxicidade aguda e a longo prazo significativamente maior que os extratos preparados pela técnica “root-dipping”.

Nas culturas de células osteoclásticas humanas, os extratos causaram efeitos inibitórios na diferenciação e função osteoclástica. Os cimentos apresentaram diferenças no perfil de resposta em função da dose e do tempo de exposição e também nas vias de sinalização intracelulares. No entanto, para tempos de exposição prolongados, parece haver uma resposta celular adaptativa, o que associado às capacidades de resposta *in vivo* (fluxo contínuo de fluidos), sugere que após um período de tempo variável, a citotoxicidade dos cimentos nas células osteoclásticas pode estar minimizada.

Nas co-culturas, os extratos dos cimentos provocaram efeitos inibitórios nas células osteoclásticas e osteoblásticas. Verificou-se uma diminuição dependente da dose na atividade da TRAP (marcador osteoclástico) e na ALP (marcador osteoblástico). O efeito inibitório foi mais evidente nas duas primeiras semanas, tendo-se depois verificado uma estabilização ou aumento da atividade da TRAP e da ALP, o que sugere uma resposta celular adaptativa. Outros parâmetros foram afetados de forma semelhante, nomeadamente a capacidade de reabsorção dos osteoclastos e a expressão de genes osteoblásticos e osteoclásticos. Tal como nas situações experimentais anteriores, os cimentos mostraram diferenças em função da dose e do tempo de exposição e também na modulação de vias de sinalização importantes na osteoclastogénese e na osteoblastogénese. Os resultados mostraram ainda uma maior

sensibilidade dos osteoblastos aos efeitos tóxicos dos extratos e uma menor capacidade de adaptação durante a exposição prolongada, o que pode sugerir uma alteração na interação entre os dois tipos celulares, comprometendo o metabolismo ósseo local.

A interpretação e comparação dos resultados deste estudo não são uma tarefa fácil, dada a grande variação dos efeitos de cada cimento e de cada dose dos extratos em cada um dos parâmetros analisados e em cada tipo celular. Nenhum dos cimentos estudados é totalmente biocompatível, todos apresentando algum grau de citotoxicidade, o que é expectável atendendo a outras propriedades exigidas para estes materiais, nomeadamente o efeito antibacteriano. Uma vez que a área de contacto entre o material e os tecidos vivos da região periapical, em situação clínica normal, é muito reduzido, e como *in vivo* existem mecanismos de depuração e neutralização das substâncias tóxicas, os resultados deste tipo de estudo de contacto directo devem ser interpretados com cautela e idealmente deveriam ser comparados com os de estudos clínicos a longo prazo.