

INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS PELOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS SEALAPEX E TOPSEAL

*Celso Emanuel de Souza Queiroz**

*Janir Alves Soares***

*Renato de Toledo Leonardo****

*Janira de Andrade Melo Queiroz*****

RESUMO — *Avaliou-se em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos a citotoxicidade dos cimentos endodônticos, Topseal e Sealapex, quanto à indução da produção de óxido nítrico (NO). Após a pulverização, 100ml da suspensão, contendo 18mg/ml dos respectivos cimentos, foram adicionados em placa de cultura de tecido, contendo macrófagos na concentração de $5,0 \times 10^6$ células/ml. Após incubação, a 37°C, em 5% de CO₂, verificou-se pelo leitor ELISA automático que a produção de NO pelo Topseal variou de 191,7 a 321,5 mmols, enquanto para o Sealapex esses valores foram significativamente menores, da ordem de 38,6 a 106,7mmols. Possivelmente, a maior citotoxicidade do Topseal deve-se à presença da resina epóxica e à liberação de formaldeído.*

PALAVRAS-CHAVE: *Óxido nítrico; Macrófagos; Obturação canal radicular.*

*Doutor em Endodontia - Prof. Adjunto (DSAU/UEFS - Odontologia) E-mail: celsonqueiroz@joventinosilva.com.br

**Doutor em Endodontia - Prof. Adjunto de Endodontia das Faculdades Federais Integradas de Diamantina – FAFEID-MG.

***Doutor em Patologia Bucal – Prof. Assistente do Curso de Odontologia da UNESP – Araraquara – SP. E-mail:

****Mestre em Clínica Odontológica – Prof. Assistente do Curso de Odontologia da UEFS – Feira de Santana – BA. E-mail: Universidade Estadual de Feira de Santana – Dep. de Saúde. Tel./Fax (75) 3224-8089 - BR 116 – KM 03, Campus - Feira de Santana/BA – CEP 44031-460. E-mail: sau@uefs.br

INTRODUÇÃO E REVISTA DA LITERATURA

A obturação representa a última etapa clínico-operatória do tratamento dos canais radiculares, sendo constituída essencialmente por guta-percha. A adição de um agente cimentante visa, principalmente, a redução da microinfiltração marginal em toda a extensão da obturação mediante o preenchimento dos vazios entre a guta-percha e as paredes dos canais radiculares. Devido ao maior escoamento, os cimentos avançam pelas regiões de istmos, canais secundários e acessórios, penetrando, também, em variada extensão, nos túbulos dentinários (AZAR et al., 2000; COHEN et al., 2000; HUANG et al., 2002; KOULAOUZIDOU et al., 1998; PERASSI et al., 2004). Nos canais radiculares, quer seja previamente ou após a reação de presa ou endurecimento, os cimentos entram em contato com os tecidos periapicais mediante a dissolução pelos fluidos teciduais. Embora seja de impossível controle clínico, ocorre também, acidentalmente, freqüentes extravasamentos periapicais via forame apical, canais secundários e laterais (PULGAR et al., 2002).

Conquanto os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol sejam os mais utilizados na obturação dos canais radiculares, visando melhor resposta reparadora apical e periapical, foram desenvolvidos cimentos à base de hidróxido de cálcio, a exemplo do Sealapex e com o intuito de melhor selamento marginal, surgiram os cimentos resinosos, a exemplo do Topseal (AZAR et al., 2000; COHEN et al., 2000; LEONARDO et al., 1999; PERASI et al., 2004). Histologicamente, além do nível apical das obturações e da consistência do cimento, as suas propriedades físico-químicas e composição química influenciam grandemente na reestruturação dos tecidos periapicais após a obturação (GEROSA et al., 1995; KOULAOUZIDOU et al., 1998). No tocante à biocompatibilidade, pelo fato dos cimentos endodônticos serem substâncias estranhas ao organismo, *no-self*, o padrão reparativo observado será consequência do somatório das particulares respostas dos vários tipos de células presentes na região periapical. Por conseguinte, a primeira reação orgânica que ocorre é uma tentativa de fagocitose, principalmente pelos macrófagos (PERASSI et al., 2004), sendo que nesse processo

ocorre a síntese e liberação de inúmeras biomoléculas, principalmente com ação pró-inflamatória, a exemplo das interleucinas 1-alfa e beta (IL-1 α , IL- β); fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); metabólicos do ácido aracdônico, como as prostaglandinas (PGE₂) e subprodutos nitrogenados, a exemplo do óxido nítrico (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; HUANG et al., 2002; IALENT et al., 1992; MILETIC et al., 2003; PERASÍ et al., 2004; SOARES; QUEIROZ, 2001; TAKEICHI et al., 1998) .

O óxido nítrico é um derivado do aminoácido L-arginina pela atividade enzimática de três dioxigenases, denominadas óxido nítrico sintetases (ONS). Dois isômeros dessa enzima são expressos na forma constitutiva (cONS) em células endoteliais, nos neurônios e músculos esqueléticos. O terceiro isômero induzido (iONS) é identificado nas células do sistema imune, a exemplo dos macrófagos (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Para Moncada, Parmer e Higgs, (1991), este radical livre gasoso participa de vários processos fisiológicos e patológicos no organismo, a exemplo: 1) regula a pressão sangüínea, 2) suprime a atividade dos macrófagos, 3) inibe da adesão de leucócitos ao endotélio vascular e 4) promove a apoptose. Takeichi e outros (1998) verificaram que diversas células presentes nos cistos apicais produzem óxido nítrico, a exemplo das epiteliais, endoteliais, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos, principalmente as situadas próximas dos vasos sangüíneos. Portanto, infere-se que o NO participa de mecanismos mantenedores das respostas inflamatórias no periápice, o que está de acordo com Shimauchi e outros (2001) que identificaram elevadas concentrações de óxido nítrico no exsudato de lesões periapicais. Uma vez que o óxido nítrico mantém significativa associação com a destruição tecidual mediada pelos processos inflamatórios crônicos, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade, mediante a síntese de óxido nítrico, de dois cimentos endodônticos, um contendo resina epóxica e o outro à base de hidróxido de cálcio, em cultura de macrófagos.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se um cimento à base de resina epóxica, o Topseal (Dentsply, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e outro à base de hidróxido de cálcio Sealapex (Kerr/Sybron, Romulus, MI, USA), ambos apresentados na formulação pasta/pasta. Os cimentos foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes; assim, partes iguais (6cm) da pasta base e catalisadora foram misturadas com uma espátula sobre uma placa de vidro, até obter-se uma mistura homogênea. Em seguida, foram armazenados em recipiente metálico, sob relativa umidade, parcialmente coberto, até completar a reação de presa. Para obtenção das soluções, os cimentos endurecidos foram fracionados e pulverizados em um sonicador (Sonic & Materials, Inc. Danbury, CT. USA). Após pesados numa balança analítica de precisão (Mettler AJ150, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Switzerland), foram diluídos em polietileno glicol 400, obtendo-se soluções em concentração de 18mg/ml que foram mantidas em tubos para centrífuga (Corning Inc.) com capacidade para 15mL para autoclavagem. Para obtenção dos macrófagos, injetou-se 3,0ml de solução de tioglicolato de sódio (Difco, São Paulo, Brazil) na cavidade abdominal de seis camundongos Swiss, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas. Os procedimentos seguintes foram realizados em câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil). Noventa e seis horas após a estimulação/ativação, os animais foram sacrificados por asfixia e, após a anti-sepsia do abdômen com álcool iodado a 3,0%, realizou-se a exposição do peritônio. Com seringa e agulha descartáveis, esterilizadas, introduziu-se na cavidade abdominal, 5,0ml de solução salina fosfatada tamponada (Difco), pH 7,2. Após massagem da cavidade abdominal, o conteúdo foi recuperado com seringa e agulha, e transferido para tubo de centrífuga, esterilizado, com capacidade para 15ml. O lavado peritoneal de cada animal, foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos. Após o desprezo do sobrenadante, 1,0ml de PBS foi adicionado às células e feita nova homogeneização e centrifugação, manobra essa repetida duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1,0ml de meio RPMI-1640 (Sigma, St.

Louis, USA), contendo 100U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma), 2µg de L-glutamina (Sigma) e 5,0% de soro fetal bovino (Cutilab, Campinas/SP, Brasil). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, para obtenção de uma concentração de $5,0 \times 10^6$ células/ml. Alíquotas de 100µl da suspensão contendo as células foram colocadas em placa de cultura de tecido com 96 poços, esterilizadas (Corning, New York 14831, USA). Após a adição de 100µl de cada solução dos cimentos à placa de cultura de tecidos contendo os macrófagos, fez-se incubação por 48 horas, a 37°C, em uma tensão de 5,0% de CO₂. Na fase final, 50µl do sobrenadante da cultura de células foram removidos e colocados em outra placa. Acrescentaram-se 50µl do reagente de Griess e deixado em repouso por dez minutos à temperatura ambiente, quando, então procedeu-se à determinação da concentração de óxido nítrico utilizando o leitor ELISA automático (ORGANON, Reader 2001, USA) com um filtro 540 nanômetros. Em cada animal os procedimentos foram realizados em quadruplicatas, ou seja, os resultados obtidos de cada animal representaram uma média oriunda de 4 testes, resultando num total de 24 leituras para cada cimento testado. O grupo-controle negativo constou de suspensão celular sem cimentos endodônticos. Os resultados foram expressos em micromols (µmols) a partir de uma curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações micromolares conhecidas de óxido nítrico. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância, com nível de significância estabelecido em 5% ($\alpha < 0,05$).

RESULTADOS

A liberação de óxido nítrico em micromols (µmols) pelos cimentos Sealapex e Topseal estão expressos na Tabela I. Os dois cimentos induziram a produção de NO pelos macrófagos em diferentes amplitudes. Assim, verificou-se que a liberação de óxido nítrico pelo Topseal variou de 191,7 a 321,7µmols, com média de $285,55 \pm 72,73$ µmols. Para o Cimento Sealapex, esse valor oscilou de 38,6 a 106,7µmols, com média de $67,72 \pm 34,29$ µmols. Pela análise de variância, verificou-se que

a maior liberação de óxido nítrico pelo Topseal foi estatisticamente significativa ($\alpha < 0,05$). A comparação com o grupo-controle leva a concluir que ambos cimentos induziram significativa produção de óxido nítrico ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1- Liberação de óxido de nítrico, em mmols, pelos cimentos Topseal e Sealapex em cultura de macrófagos peritoneais de camudongos Swiss.

Camundongos Swiss	Topseal	Sealapex
1	191,7	38,6
2	227,8	34,7
3	397,2	106,1
4	271,2	39,7
5	303,7	106,7
6	321,7	80,5
Média	285,55	67,72

DISCUSSÃO

A cultura de células representa uma metodologia simples, de custo relativamente baixo, de relevância científica, reproduzível e muito utilizada na avaliação das propriedades biológicas básicas dos materiais dentários, uma vez que muitos fatores e variáveis podem ser controlados (CATANZARO; PERCINOTO, 1984; FLORA FILHO; ZILBERTEIN, 2000; HUANG et al., 2002; KOULAOUZIDOU et al., 1998; LEONARDO et al., 2000; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; PERASSI et al., 2004). Dada a complexidade de interações celulares e reações sinérgicas pertinentes ao processo inflamatório e de reparo na região periapical, após a obturação dos canais radiculares (LEONARDO et al., 1997), neste trabalho, a cultura de células teve a finalidade de particularizar uma das múltiplas respostas moleculares dos macrófagos a dois cimentos endodônticos, uma vez que essas células participam ativamente da fagocitose, bem como sintetizam e secretam substâncias extra e intracelulares, tais como, enzimas, citocinas e fatores de crescimento (MATSUMOTO; INOUE; MATSUMOTO, 1989; PERASSI et al., 2004), e no nosso caso específico, a

síntese de óxido nítrico, como um importante indicador do estado de agressão ou stress imposto às células. Assim, cultura de macrófagos peritoneais em contato com suspensão do cimento Topseal, produziu significativas quantidades de NO, comparativamente ao Sealapex. Essa maior citotoxicidade do cimento Topseal deve-se, possivelmente, à presença de elementos em sua fórmula, a exemplo da resina epóxica, ou produtos intermediários da sua reação de presa, tal como o formaldeído (LEONARDO et al., 1999).

Historicamente, objetivando melhoras das propriedades físico-químicas e clínicas dos cimentos endodônticos, a exemplo da adesão à estrutura dentária, maior tempo de trabalho, fácil mistura e melhor selamento apical, Schroeder desenvolveu, em 1954, um cimento à base de resina epóxica, o AH26. Posteriormente, mudanças na fórmula original deram origem às novas versões, como o Topseal ou AHPlus (COHEN et al., 2000; PULGAR et al., 2002). Dada a favorável resposta biológica dos tecidos periapicais ao hidróxido de cálcio, desenvolveram um cimento que libera óxido de cálcio, o Sealapex.

Inúmeros estudos têm demonstrado menor agressividade celular para os cimentos à base de hidróxido de cálcio, em comparação com os que contêm óxido de zinco e eugenol ou resinosos (BRISEÑO; WILLERSHAUSEN, 1992; CATANZARO; PERCINOTO, 1984; GEROSA et al., 1995; HUANG et al., 2002; MATSUMOTO; INOUE; MATSUMOTO, 1989; NAKAMURA et al., 1986; PERASSI et al., 2004). Assim, em culturas de células de polpa de ratos, Matsumoto, Inoue e Matsumoto (1989) verificaram que o cimento resinoso AH26 inibiu completamente a síntese de DNA; em contrapartida, o Sealapex apresentou melhor compatibilidade celular. No estudo de Nakamura e outros (1986), suspensões do cimento AH26 a 20% determinaram progressivo aumento da morte das células epiteliais, em função do período de incubação, com percentuais variando de 85,6% a 99,7% num período de 1 a 3 dias, respectivamente. Enquanto um cimento (Neodyne), contendo óxido de zinco, hidróxido de cálcio e eugenol, determinou reduzida citotoxicidade, comportando-se de forma semelhante ao cimento Canals, à base de óxido de zinco e eugenol; por outro lado, um cimento, contendo óxido

de zinco, hidróxido de cálcio e formaldeído, apresentou comportamento semelhante ao AH26.

No estudo de Gerosa e outros (1995), o cimento AH26 determinou a maior degradação de fibroblastos gengivais, enquanto o Pulp Canal Sealer causou reduzida morte celular. A citotoxicidade do AH26 tem sido atribuída à amina (hexametilenotetramina), que em condições ácidas, decompõe-se liberando amônia e formaldeído durante a presa, e a resina epóxica éter de bisfenol A diglicidil. Schweikl e outros (1995) ressaltaram também a ação mutagênica do formaldeído. No AH Plus, o formaldeído deriva da reação da resina epóxica com as aminas. Cohen e outros (2000) verificaram que a liberação de formaldeído (CH_2O) pelo cimento AH26 foi de 1.347ppm. Para o AHPlus este valor foi de 3,9ppm, embora o fabricante afirme que o AHPlus seja “formaldehyde-free”.

Briseño e Willershausen (1992) observaram elevada síntese protéica em culturas de fibroblastos na presença de cimentos à base de hidróxido de cálcio, com melhor performance para o Sealapex, num período de 21 dias. Quando em contato com cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, a exemplo do Procosol e Endoseal, ocorreu redução da incorporação da leucina radioativa pelas referidas células. No entanto, a menor síntese protéica, ou seja, a maior citotoxicidade foi observada para os cimentos resinosos, a exemplo do AH26. Similar comportamento foi observado frente aos cimentos Endoflas FS, possivelmente, devido à presença de iodofórmio e para-monoclorofenol. Em outro experimento, avaliando o índice de influxo e fusão de macrófagos, frente ao implante de cimentos endodônticos no subcutâneo de ratos, Catanzaro e Percinoto (1984) relataram para o óxido de zinco e eugenol, AH26 e hidróxido de cálcio, elevada, moderada e reduzida citotoxicidade, respectivamente. Ademais, Perassi e outros (2004) em recente estudo, verificaram em culturas de macrófagos que o Sealapex induziu menor produção de TNF-a se comparado ao Endomethasone.

Ideal que os cimentos endodônticos fossem biocompatíveis, apresentassem satisfatórias propriedades físico-químicas, fossem bem tolerados pelos tecidos periapicais e estimulassem a reorganização dos tecidos alterados (HUANG et al., 2002). Embora os cimentos

sofram, após a presa, variada dissolução tecidual, certamente, os efeitos adversos dos cimentos sobre os tecidos periapicais serão mais marcantes quando ocorrer extravasamento periapical (PULGAR et al., 2002). Assim, poderão determinar um quadro reacional periapical, com grande acúmulo de macrófagos, constituindo granulomas de baixa renovação, que podem responder pelos insucessos endodônticos. A exemplo, no estudo de Wayman e outros (1992), na análise histológica de 58 lesões periapicais refratárias ao tratamento, 17 apresentavam em seu interior cimento endodôntico, o qual foi considerado o principal causador dos fracassos endodônticos.

Numa análise conjunta da biologia periapical após a obturação dos canais radiculares, Soares e Queiroz (2001) relataram que nas reações inflamatórias crônicas do periápice, a exemplo dos abscessos, granulomas e cistos, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, fagocitando partículas e substâncias, e em resposta, liberando inúmeras biomoléculas mantenedoras da resposta inflamatória, a exemplo das citocinas. Uma vez cessado o estímulo citotóxico, essas células passam a participar do processo de reparo mediante a estimulação ou produção de fatores de crescimento, a exemplo do TGF- β . Assim, ocorreria a redução do infiltrado inflamatório, a substituição do tecido de granulação inflamatório por tecido de granulação cicatricial, intensa deposição e organização das fibras do ligamento periodontal apical, regeneração óssea, cementária e, finalmente, o selamento do forame apical por tecido mineralizado. Levando-se em conta que a produção de óxido nítrico pelos macrófagos representa uma das inúmeras formas de resposta dessas células aos materiais obturadores, a reduzida citotoxicidade provida pelo Sealapex corrobora os satisfatórios resultados histológicos com tal cimento (LEONARDO et al., 1997), razão pela qual tem sido denominado por Huang e outros (2002) de “cimento biológico” o que tende a ampliar a sua utilização na clínica endodôntica.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos é lícito concluir que:

1-Os cimentos Topseal e Sealapex, induziram, em diferentes magnitudes, a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais.

2-Na avaliação da agressão celular, por meio da produção de óxido nítrico, se comparado ao cimento Topseal, o Sealapex determinou reduzida citotoxicidade.

INDUCTION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN MACROPHAGE CULTURE BY SEALAPEX AND TOPSEAL ENDODONTIC SEALERS

ABSTRACT — *The cytotoxicity of Topseal and Sealapex endodontic sealers was evaluated in mice peritoneal macrophage cultures, in relation to induction of nitric oxide (NO). After pulverization, 100 μ l of a suspension containing 18 mg/ml of the cements was added to the macrophage-containing tissue culture dishes at 5.0×10^6 cells/mol concentration. After incubation at 37°C, in CO₂ at 5%, it was verified through ELISA automatic reading that the production of NO by Topseal ranged from 191.7 to 321.5 μ mols, whereas these values were significantly lower for Sealapex, i.e., 38.6 to 106,7 μ mols. It is possible that the greater cytotoxicity of Topseal is due to the presence of epoxy resin and release of formaldehyde.*

KEY WORDS: *Nitric Oxide; Sealapex; Root canal obturation.*

REFERÊNCIAS

AZAR, N.G. et al., *In vitro* cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **Journal of Endodontics**, v. 26, p.462-655, 2000.

BRISEÑO, B.M.; WILLERSHAUSEN, B. Root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts. III. Calcium hydroxide-based sealers. **Journal of Endodontics**. v.18, n.3, p.110-123, 1992.

CATANZARO, S.A., PERCINOTO, C. Effect of some endodontic materials on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. **Journal of Endodontics**, v.10, n.3, p.101-104, 1984.

COHEN, B.I. et al., An *in vitro* study of the cytotoxicity of the two root canal sealers. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 4, p. 228-229, 2000.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 46, p. 265-271, 2000.

GEROSA, R. Cytotoxicity evaluation of six root canals sealers. **Journal of Endodontics**, v. 27, p. 446-8, 1995.

HUANG, F.M. et al., Cytotoxicity of resin-zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. **International Endodontic Journal**, v.35, p.153-158, 2002.

IALENT, A., et al., Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal Pharmacology**, v. 211, p.177-182, 1992.

KOULAOUZIDOU, E.A. et al., Cytotoxicity of three resin-based root canals sealers: an in vitro evaluation. **Endodontic Dental Traumatology**, v. 14, p. 182-185, 1998.

LEONARDO, M.R. et al., Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 88, n.2, p.221-225, 1999.

LEONARDO, R.T., CONSOLARO, A., CARLOS, I.Z., LEONARDO, M.R. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. **Journal of Endodontics**. v. 26, p. 328-330, 2000.

LEONARDO, R.T.; LEONARDO M.R.; CONSOLARO, A., Calcium hydroxide root canal sealers-histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 7, p. 428-432, 1997.

MATSUMOTO, K.; INOUE, K.; MATSUMOTO, A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. **Journal of Endodontics**, v.15, n.2, p.60-67, 1989.

MILETIC, I., et al., Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AHPlus sealers. **International Endodontic Journal**. v. 36, p. 330-335, 2003.

MONCADA, S; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A.. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** v. 43, p. 109-142, 1991.

NAKAMURA, H. et al., Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. **Journal of Endodontics**, v.12, n. 4, p.156-160, 1986.

PERASSI, F.T. et al., Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, Sealapex and Endomethasone. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 7, p. 543-547, 2004.

PULGAR, R. et al., The effect of AH 26 and AH Plus on MCF-7 breast cancer cell proliferation *in vitro*. **International Endodontic Journal**. v. 35, p. 551-556, 2002.

SCHWEIKL, H. Mutagenicity of AH26 in an vitro mammalian cell mutation assay. **Journal of Endodontics**, v. 21, p. 407-410, 1995.

SHIMAUCHI, H. et al., Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 12, p. 749-52, 2001.

SOARES, J.A.; QUEIROZ, C.E.S. Patogenesis periapical: aspectos clínicos, radiográficos e tratamento da reabsorção óssea e radicular de origem endodôntica. **Jornal Brasileiro de Endodontia**, v. 2, n. 5, p.124-135, 2001.

TAKEICHI, O. et al., Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 24 n. 3 p.157-160, 1998.

WAYMAN, B.E. et al. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 4, p.152-155, 1992.