

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DE CIMENTOS OBTURADORES  
ENDODÔNTICOS SOBRE A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS M1 E M2**

**Sônia Teresa de Oliveira Mendes**

**BELO HORIZONTE**

**2007**

**Sônia Teresa de Oliveira Mendes**

**EFEITO DE CIMENTOS OBTURADORES  
ENDODÔNTICOS SOBRE A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS M1 E M2**

**TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE DOUTORADO DA FACULDADE  
DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM  
ODONTOLOGIA.**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**ORIENTADORES: PROF. DR. ANTÔNIO PAULINO RIBEIRO SOBRINHO**

**PROF. DRA. LEDA QUERCIA VIEIRA**

**Belo Horizonte**

**2007**

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Adolfo e filho Adolfinho pelo amor e pela compreensão.

Aos meus pais José Lara e Conceição pelo exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho e Prof. Dra. Leda Quercia Vieira pelo exemplo de competência e dedicação.

A toda minha família e amigos pelo apoio e carinho demonstrados.

Aos meus colegas de laboratório de Gnotobiologia e Imunologia pela amizade e inestimável ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vani Rodrigues de Moraes por me apoiar nos primeiros passos rumo a docência.

A Prof. Dra. Maria Ilma de Souza Côrtes pelo incentivo na busca de minhas realizações.

A Dra Maria Letícia Ramos Jorge, pela orientação na análise estatística.

## RESUMO

Os cimentos obturadores endodônticos, podem entrar em contato com os tecidos perirradiculares no momento da obturação, mesmo quando não são grosseiramente forçados através dos vários portais de saída do Sistema de Canais Radiculares (SCR). Por isso, a questão da biocompatibilidade reveste-se da maior importância. Os macrófagos atuam como importantes células acessórias e efetoras nas respostas imunes. Recentemente, a literatura demonstrou que os macrófagos podem ser divididos em dois tipos: M1 (ativados pela produção de IL-12) e M2 (ativados alternativamente na ausência de IL-12), de acordo com sua habilidade em produzir diferentes tipos de respostas. Neste estudo analisamos o efeito de dois cimentos obturadores endodônticos (PCS EWT® e Endofill®) sobre a atividade de macrófagos inflamatórios M1 (provenientes de camundongos C57BL/6) e M2 (provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>), onde avaliamos a viabilidade, a aderência ao vidro, a fagocitose de *Saccharomyces boulardii*, a produção de Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs), estimulada e não com zymosan, como também a produção de Óxido Nítrico (NO) e das citocinas TNF, IL-12 e IL-10 estimulada e não com *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus anaerobius*, na presença e ausência de IFN- $\gamma$ . A viabilidade celular não foi alterada na presença de ambos cimentos obturadores, entretanto a aderência ao vidro e a fagocitose foram prejudicadas. Os cimentos testados interferiram na produção de ROIs pelos macrófagos M1, não afetando a produção destes radicais pelos macrófagos M2. Contrariamente, a produção de NO por macrófagos M1 não foi alterada na presença dos cimentos enquanto os mesmos inibiram a produção de NO pelos macrófagos M2 estimulados com *F. nucleatum*. Nenhum dos cimentos obturadores endodônticos interferiu com a produção de IL-12p70 pelos macrófagos M1. A produção de TNF- $\alpha$ , estimulada por *F. nucleatum*, por macrófagos M1, foi prejudicada na presença do PCS EWT®. Entretanto, a pré-incubação tanto com PCS EWT® quanto com Endofill® interferiu negativamente com a produção desta citocina pelos macrófagos M1 quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ . A produção de TNF- $\alpha$  estimulada com *F. nucleatum* na presença de IFN- $\gamma$ , por macrófagos M2, foi prejudicada na presença de ambos os cimentos. Por outro lado, a produção desta citocina por macrófagos M2 foi prejudicada somente pelo Endofill® quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ . A produção de IL-10 por macrófagos M1 não foi alterada na presença de ambos os cimentos.

PCS EWT® inibiu a produção de IL-10 pelos macrófagos M2 somente quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius*. Podemos concluir que os cimentos obturadores testados podem inibir a atividade de macrófagos.

Palavras chaves: cimentos endodônticos, sistema imunológico, macrófagos M1 e M2

## ABSTRACT

Root canal sealers are brought into contact with periapical tissues when finishing endodontic therapy, even when they are not severely extruded through root canal orifices. Therefore, their biological properties are considered to be important. Macrophages have a central role in both innate immunity and adoptive responses. Recent studies have revealed that there are two types of macrophages: M1 (activated by IL-12) and M2 (activated in the absence of IL-12) based on their ability to produce different responses. This study aimed at analyzing the effect of two endodontic sealers (PCS EWT® and Endofill®) on the activity of M1 (obtained from C57BL/6 mice) and M2 (obtained from IL-12/23 p40 deficient C57BL/6 mice) inflammatory macrophages. Cellular viability, cellular adherence, phagocytosis of *S. boulardii*, production of reactive oxygen intermediates (ROIs), nitric oxide (NO), TNF, IL-12 and IL-10 were assessed. Production of ROIs was stimulated by zymosan. Production of cytokines was stimulated with *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius* and IFN- $\gamma$ . Cellular viability was not affected in the presence of either endodontic sealers however, the adherence and the phagocytic activity were impaired. Both sealers inhibited ROIs production only by M1 macrophages. On the other hand, NO production by M1 macrophages was not affected by the sealers, while the same sealers impaired NO production by M2 macrophages when stimulated with *F. nucleatum*. None of the sealers affected IL-12p70 production by M1 macrophages. TNF- $\alpha$  production by M1 macrophages, when stimulated with *F. nucleatum*, was impaired in the presence of PCS EWT®. However, the pre-incubation with PCS EWT® or Endofill® affected the production of this cytokine by M1 macrophages when the cultures were stimulated with *P. anaerobius* in the presence of IFN- $\gamma$ . TNF- $\alpha$  production by M2 macrophages, when stimulated with *F. nucleatum* and IFN- $\gamma$ , was impaired by both endodontic sealers. On the other hand, the production of this cytokine by M2 macrophages was inhibited only by Endofill® when the cultures were stimulated with *P. anaerobius* and IFN- $\gamma$ . IL-10 production by M1 macrophages was not affected by either root canal sealer. PCS EWT® inhibited IL-10 production by M2 macrophages only when the cultures were stimulated with *P. anaerobius*. We can conclude that both endodontic sealers may impair macrophage activities.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Viabilidade de macrófagos M1 em placas de 24 poços.....	53
<b>Gráfico 2</b> - Viabilidade de macrófagos M2 em placas de 24 poços.....	53
<b>Gráfico 3</b> - Viabilidade de macrófagos M1 em tubos de polipropileno.....	54
<b>Gráfico 4</b> - Viabilidade de macrófagos M2 em tubos de polipropileno.....	54
<b>Gráfico 5</b> - Aderência ao vidro de macrófagos M1 e M2.....	55
<b>Gráfico 6</b> - Aderência e fagocitose de <i>S. boulardii</i> por macrófagos M1.....	56
<b>Gráfico 7</b> - Aderência e fagocitose de <i>S. boulardii</i> por macrófagos M2.....	57
<b>Gráfico 8</b> - Cinética de produção de ROIs por macrófagos M1, estimulados e não com zymosan.....	58
<b>Gráfico 9</b> - Produção total de ROIs por macrófagos M1, estimulados e não com zymosan....	58
<b>Gráfico 10</b> - Cinética de produção de ROIs por macrófagos M2, estimulados e não com zymosan.....	59
<b>Gráfico 11</b> - Produção total de ROIs por macrófagos M2, estimulados e não com zymosan..	60
<b>Gráfico 12</b> - Produção de NO por macrófagos M1 estimulados e não com <i>F. nucleatum</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	61
<b>Gráfico 13</b> - Produção de NO por macrófagos M2 estimulados e não com <i>F. nucleatum</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	62
<b>Gráfico 14</b> - Produção de NO por macrófagos M1 estimulados e não com <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	62
<b>Gráfico 15</b> - Produção de NO por macrófagos M2, estimulados e não com <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	63
<b>Gráfico 16</b> - Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos M1, estimulados e não com <i>F. nucleatum</i> , <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	64
<b>Gráfico 17</b> - Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos M2, estimulados e não com <i>F. nucleatum</i> , <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	64
<b>Gráfico 18</b> - Produção de IL-12 por macrófagos M1, estimulados e não com <i>F. nucleatum</i> , <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	65



**Gráfico 19** - Produção de IL-10 por macrófagos M1, estimulados e não com *F. nucleatum*, *P. anaerobius*, na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....67

**Gráfico 20** - Produção de IL-10 por macrófagos M2, estimulados e não com *F. nucleatum*, *P. anaerobius*, na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 aderidas ao vidro.....	91
TABELA 2 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 aderidos ao vidro.....	91
TABELA 3 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 aderidas ao vidro.....	91
TABELA 4 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 aderidos ao vidro.....	91
TABELA 5 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 e M2 aderidos ao vidro.....	92
TABELA 6 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 com leveduras aderidas.....	92
TABELA 7 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 com leveduras aderidas.....	92
TABELA 8 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 com leveduras fagocitadas.....	92
TABELA 9 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 com leveduras fagocitadas.....	93
TABELA 10 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 com leveduras aderidas.....	93
TABELA 11 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 com leveduras aderidas.....	93
TABELA 12 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 com leveduras fagocitadas.....	93
TABELA 13 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 com leveduras fagocitadas.....	94
TABELA 14 - Resultados da análise estatística para o número de leveduras aderidas/macrófagos M1 e M2.....	94
TABELA 15 - Resultados da análise estatística para o número de leveduras fagocitadas/macrófagos M1 e M2.....	94

TABELA 16 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, acrescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ .....	94
TABELA 17 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1 com e sem estímulo das bactérias gram-negativas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .....	95
TABELA 18 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, acrescidos e não de <i>P. anaerobius</i> , com e sem IFN- $\gamma$ .....	95
TABELA 19 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1, com e sem estímulo das bactérias gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .....	96
TABELA 20 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, acrescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ .....	96
TABELA 21 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M2, com e sem estímulo das bactérias gram-negativas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .....	97
TABELA 22 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, acrescidos e não de <i>P. anaerobius</i> , com e sem IFN- $\gamma$ .....	97
TABELA 23 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M2, com e sem estímulo das bactérias gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .....	98
TABELA 24 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1/M2 com e sem estímulo das bactérias gram-negativas e gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .....	98
TABELA 25 - Medidas descritivas da produção de ROIs por macrófagos M1, com e sem estímulo de zymosan.....	98
TABELA 26 - Resultados da análise estatística da produção de ROIs por macrófagos M1, estimulados e não com zymosan.....	99
TABELA 27 - Medidas descritivas da produção de ROIs por macrófagos M2, com e sem estímulo de zymosan.....	99
TABELA 28 - Resultados da análise estatística da produção de ROIs por macrófagos M2, estimulados e não com zymosan.....	99
TABELA 29 - Resultado da análise estatística para a produção de ROIs por macrófagos M1/M2 estimulados e não com zymosan.....	100
TABELA 30 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-12 p70 por macrófagos M1, acrescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> também com e sem IFN- $\gamma$ .....	100

TABELA 31 - Resultados da análise estatística para a produção de IL-12p70 de macrófagos M1, estimulados pelas bactérias <i>F. nucleatum</i> e <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	101
TABELA 32 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M1, crescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> também com e sem IFN- $\gamma$ .....	102
TABELA 33 - Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 estimulados pelas bactérias <i>F. nucleatum</i> e <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	103
TABELA 34 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M2, crescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> também com e sem IFN- $\gamma$ .....	104
TABELA 35 - Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M2 na presença e ausência das bactérias <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> , também com e sem IFN- $\gamma$ .....	105
TABELA 36 - Resultados na análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 e M2, estimulados com as bactérias <i>F. nucleatum</i> e <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	105
TABELA 37 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M1, crescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> também com e sem IFN- $\gamma$ .....	106
TABELA 38 - Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 estimulados pelas bactérias <i>F. nucleatum</i> , <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	107
TABELA 39 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M2, crescidos e não de <i>F. nucleatum</i> , com e sem IFN- $\gamma$ e <i>P. anaerobius</i> também com e sem IFN- $\gamma$ .....	108
TABELA 40 - Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M2 estimulados pelas bactérias <i>F. nucleatum</i> e <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	109
TABELA 41 - Resultados na análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 e M2, estimulados com as bactérias <i>F. nucleatum</i> e <i>P. anaerobius</i> , na presença e ausência de IFN- $\gamma$ .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: célula apresentadora de antígeno  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
BHI: *Brain Heart Infusion broth*  
BSA: albumina bovina  
CEBIO: Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais  
CD4: *cluster of differentiation 4*  
CD8: *cluster of differentiation 8*  
EDTA: ácido etileno diamino tetracético  
ELISA: *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*  
Fc: fragmento cristalizável  
GM-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos  
IFN: interferon  
IL: interleucina  
iNOS: óxido nítrico sintase indutível  
LPS: lipopolissacáride  
M1: macrófago do tipo 1  
M2: macrófago do tipo 2  
MHC: complexo principal de histocompatibilidade  
MTA: *mineral trioxide aggregate*  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato  
NK: *natural Killer*  
NO: óxido nítrico  
OPD: *o-Phenylenediamine*  
PBS: tampão salina-fosfato  
PCS EWT: *Pulp Canal Sealer Extended Work Time*  
ROIS: radicais livres de oxigênio  
SBF: soro bovino fetal  
SCR: sistema de canais radiculares  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  
Th: célula *T helper*  
TLR: receptores tipo Toll  
TNF: fator de necrose tumoral  
ZOE: cimentos a base de óxido de zinco e eugenol

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1	Sistema de Canais Radiculares (SCR).....	18
2.2	Tratamento endodôntico radical.....	19
2.3	Cimentos obturadores endodônticos.....	20
2.3.1	Cimento de Rickert.....	21
2.3.2	Cimento de Grossman.....	22
2.4	Efeitos inflamatórios e citotóxicos de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE).....	23
2.5	Efeito de outros materiais utilizados em Endodontia sobre a atividade de macrófagos	25
2.6	Macrófagos.....	27
2.7	Fagocitose .....	29
2.8	Óxido Nítrico (NO) .....	31
2.9	Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs).....	32
2.10	Fator de necrose tumoral (TNF) .....	33
2.11	Interleucina-12 (IL-12).....	34
2.11.1	Camundongos deficientes na cadeia p40 da IL-12 (IL-12/23p40-/-).....	35
2.12	Interleucina-10 (IL-10).....	35
3	OBJETIVOS .....	37
3.1	Objetivo Geral .....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
4.1	Abordagem e plano amostral.....	38
4.2	Animais e microrganismos.....	39
4.3	Cimentos obturadores endodônticos.....	40
4.4	Obtenção e cultura de células peritoneais inflamatórias .....	41
4.5	Viabilidade celular.....	42
4.6	Aderência de macrófagos ao substrato.....	43
4.7	Fagocitose da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> “in vitro”.....	43
4.7.1	Coloração com Panótico Rápido .....	44
4.7.2	Propriedades corantes das leveduras: .....	44

4.8	Produção de Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs) .....	45
4.9	Deteção de Óxido Nítrico (NO).....	46
4.10	Produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	46
4.11	Produção de Interleucina-12 (IL-12) .....	48
4.12	Produção de Interleucina-10 (IL-10) .....	49
4.13	Análises estatísticas .....	50
5	RESULTADOS .....	51
5.1	Viabilidade celular.....	51
5.1.1	Viabilidade em placa de 24 poços.....	51
5.1.2	Viabilidade em tubos de polipropileno.....	52
5.2	Aderência de macrófagos ao substrato.....	54
5.3	Fagocitose da levedura <i>S.boulardii</i> por macrófagos inflamatórios M1 e M2	54
5.4	Produção de Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs) .....	56
5.5	Produção de Óxido Nítrico (NO).....	59
5.6	Produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	62
5.7	Produção de Interleucina-12 (IL-12) .....	64
5.8	Produção de Interleucina-10 (IL-10) .....	65
6	DISCUSSÃO .....	67
7	CONCLUSÕES.....	74
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
9	ANEXOS .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

As causas mais freqüentes que nos levam a realização do tratamento endodôntico radical são as alterações irreversíveis da polpa como consequência da cárie dentária (Stashenko *et al.*, 1998).

O tratamento endodôntico consiste em limpar, formatar e obturar o SCR. A obturação consiste no estágio final do tratamento endodôntico que tem como finalidade vedar, o mais hermeticamente possível, o SCR com agentes seladores não irritantes e biocompatíveis (Schilder, 1967; Schilder, 1974).

Os cones de guta-percha associados a cimentos obturadores são os materiais mais freqüentemente utilizados para este fim (Walton & Johnson, 1998; Johnson & Gutman, 2007). Os cimentos endodônticos ganham acesso às ramificações do SCR podendo causar inflamação diretamente nos tecidos periapicais (Bombana, 1980; Geurstsen & Leyhausen, 1997; Aesaert, 2000). Mesmo em situações nas quais os cimentos não são grosseiramente forçados através do forame, inflamação é observada na maioria dos casos, pelo menos histologicamente (Pulgar *et al.*, 2002; Bernath & Szabo, 2003). Não há consenso na literatura se o efeito destes cimentos sobre os tecidos perirradiculares pode ou não interferir com o sucesso do tratamento.

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE) são amplamente utilizados na clínica endodôntica e apresentam vantagens sobre os outros sendo que a principal delas é sua longa história de utilização com êxito. Os cimentos de Rickert e Grossman são os cimentos obturadores padrão, à base de ZOE, com os quais todos os outros são comparados (Walton & Johnson, 1998; Estrela, 2004).

Os tecidos periradiculares possuem células imunocompetentes, dentre elas, os macrófagos. Os macrófagos desempenham o papel principal na patogênese da inflamação (Van Furth, *et al.*, 1972; Unanue, 1978) constituindo uma das primeiras células que entram em contato com partículas estranhas presentes nos tecidos e, para muitos autores, estas são as células predominantes (Stern *et al.*, 1981; Kawashima *et al.*, 1996).

Recentemente, foi demonstrado que existem tipos diferentes de macrófagos denominados M1 e M2 que respondem diferentemente a padrões de ativação como também expressam programas metabólicos distintos (Mills, *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003).



Levando em consideração todos estes fatores, tornou-se relevante avaliar a interferência de alguns cimentos obturadores endodônticos mais comumente utilizados na clínica endodôntica sobre a atividade de macrófagos M1 e M2 murinos elicitados peritonealmente em camundongos C57BL/6 (M1) e C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup> (M2), analisando a viabilidade, a aderência, o processo de fagocitose celular, a produção de óxido nítrico (NO), de radicais intermediários de oxigênio (ROIs), como também a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistema de Canais Radiculares (SCR)

O sistema dos canais radiculares (SCR) é complexo e seu conhecimento é extremamente importante, pois dita os parâmetros sob os quais o tratamento endodôntico será realizado, afetando as possibilidades de sucesso.

Muitos pesquisadores, ao longo dos anos, se preocuparam em desenvolver e propor novas técnicas de estudo a fim de promover um melhor entendimento deste sistema tão complexo (Preiwerk, 1901; Barret, 1925; Pucci e Reig, 1945; De Deus, 1960; Barker *et al.*, 1969; Robertson *et al.*, 1980; Pécora *et al.*, 1986; Fidel, 1988). Nos últimos anos, a tomografia computadorizada tem sido utilizada por vários pesquisadores (Bjorndal *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2000; Nance *et al.*, 2000; Zoremchhingi *et al.*, 2005), pois este método oferece informação completa e acurada sobre o número e a configuração dos canais.

A anatomia de cada dente apresenta características comuns como também variações anatômicas muito complexas como ramificações dentárias, distúrbios de desenvolvimento, canais em forma de C, baioneta, curvaturas graduais, não graduais, calcificações, reabsorções, canais achatados, afilados, dilacerados, etc. (Migliau *et al.*, 2004; Estrela, 2004). O SCR apresenta ramificações que culminam em vários portais de saída onde o tecido pulpar entra em contato com os tecidos periodontais adjacentes.

Na clínica endodôntica, torna-se importante o conhecimento da posição anatômica do forame apical e das ramificações apicais próprias (deltas, canais acessórios e secundários) situados no interior dos 3-4 mm do ápice radicular. Segundo De Deus (1992), nesta região encontra-se a maior incidência de ramificações do SCR, que mantém íntima relação com os tecidos e elementos periapicais sendo denominada de “Zona Crítica Apical”. É, pois, constituída pelos milímetros finais do canal, onde se deve controlar toda a interação do tratamento e da obturação do canal radicular no seu limite apical e onde ocorre a maioria dos problemas clínicos durante o tratamento endodôntico. Para prevenir tal fato, o “terminus” do canal deve ser acuradamente estabelecido e, o controle do comprimento de trabalho deve ser mantido durante todo o tratamento endodôntico (Nekoofar *et al.*, 2006).

Enclausurada por este complexo sistema de tecido mineralizado, encontramos a polpa que é um tecido conjuntivo similar a outros tecidos conjuntivos encontrados no corpo. A polpa, contudo, encontra-se “protegida” dos estímulos nocivos por esta barreira física rígida.

Se a integridade desta barreira for rompida, elementos nocivos, de origem externa, tem acesso a este tecido (Jontell *et al.*, 1998).

## 2.2 Tratamento endodôntico radical

A maioria das infecções pulpares ocorre como sequela da cárie, trauma e como resultado de microinfiltrações decorrentes de restaurações defeituosas. As infecções pulpares se abandonadas ao seu próprio curso, progridem para a necrose total do tecido levando ao desenvolvimento de uma lesão periapical caracterizada pela destruição do tecido ósseo circunvizinho (Stashenko *et al.*, 1998). Tanto a polpa quanto os tecidos periradiculares, reagem à infecção bacteriana ou a outros estímulos através de processos inflamatórios e reações imunológicas locais (Jontell *et al.*, 1998).

Clinicamente o tratamento endodôntico radical consiste na limpeza mecânico-química e formatação do SCR, a fim de se obter uma obturação hermética e tridimensional (Brkanic *et al.*, 2005). A limpeza refere-se à remoção mecânico-química de todo conteúdo do SCR antes e durante a formatação. A formatação refere-se a uma forma específica que atende a 5 objetivos, a saber: desenvolver uma forma cônica progressiva no preparo do SCR; fazer com que o SCR fique mais estreito apicalmente, com menor diâmetro seccional no seu término; obter o preparo cônico em múltiplos planos; manter o forame apical tão pequeno quanto prático e nunca transportar o forame (Schilder, 1967; 1974). Para que o sucesso do tratamento endodôntico seja alcançado, a relação tridimensional do canal original deve ser mantida até o final do preparo, enquanto são satisfeitos os requerimentos de desbridamento ótimo e facilidade de obturação.

A obturação constitui o coroamento do tratamento endodôntico, no qual todo o espaço anteriormente ocupado pela polpa deve ser selado tridimensionalmente e idealmente por materiais inertes, dimensionalmente estáveis e biologicamente compatíveis (Schilder, 1967; 1974). A obturação tem como objetivo vedar tridimensionalmente o SCR o que impede a percolação de fluidos dos tecidos periradiculares para seu interior e sua contaminação pelos microrganismos presentes na cavidade oral. Assim, impede também que qualquer microrganismo que porventura não tenha sido removido durante os procedimentos de limpeza e formatação recolonize o SCR, como também cria um ambiente biológico favorável para que se processe a cicatrização dos tecidos periradiculares (Nguyen, 1994; Stock *et al.*, 1996;

Gutman & Witherspoon, 1998). O sucesso da obturação do SCR depende da excelência da configuração da cavidade endodôntica, ou seja, de sua limpeza e modelagem (Johnson & Gutman, 2007).

Uma grande variedade de materiais obturadores vem sendo proposta através dos anos. Utilizaram-se desde o gesso paris, asbesto e bambu, até o chumbo em folha e metais preciosos como ouro e irídio-platina. Muitos materiais já foram condenados pelos profissionais, por não serem práticos, racionais ou biologicamente aceitáveis (De Deus, 1992). O emprego da guta-percha associada a um cimento endodôntico representa consenso mundial quanto aos materiais indicados para se obturar o SCR (De Deus, 1992; Estrela, 2004). A guta-percha, introduzida por Bowman em 1867, é o material mais amplamente aceito e utilizado por ser menos tóxico, menos alergênico e menos irritante. Suas principais aplicações clínicas decorrem de suas propriedades isolantes, impermeabilizantes e termoplásticas. É uma substância semelhante à borracha e origina-se do látex de árvores da Malásia, Brasil e México (De Deus, 1992). Apesar de suas características favoráveis, na obturação do SCR, a guta-percha deve estar associada a cimentos obturadores (Lovdahl, 1992). Na tentativa de se conseguir a obturação do SCR a mais hermética possível, muitas vezes, ocorre o extravazamento de guta-percha e, muito mais freqüentemente, do cimento obturador para os tecidos periradiculares (Aesaert, 2000).

### **2.3 Cimentos obturadores endodônticos**

O cimento obturador endodôntico é necessário para selar pequenos espaços entre a guta-percha e as paredes dos canais, atuando também como lubrificante e auxiliando na adaptação destes cones (Walton & Johnson, 1998; Johnson & Gutman, 2007). Neste sentido, reduz a microinfiltração marginal e, devido a seu escoamento, o cimento avança pelas regiões de istmos, canais secundários e acessórios, penetrando também, em extensões variáveis, nos túbulos dentinários (Huang *et al.*, 2002; Perassi *et al.*, 2004).

Os cimentos endodônticos, mesmo quando não são grosseiramente forçados através dos vários portais de saída do SCR, entram em contato com os tecidos periapicais (Pulgar *et al.*, 2002; Bernath & Szabo, 2003).

Grossman (1988) resumiu as propriedades de um cimento ideal em: exibir aderência quando manipulado, a fim de promover boa adesividade entre ele e as paredes do canal após a

presa; promover selamento hermético; ser radiopaco, para que possa ser visualizado na radiografia; as partículas do pó devem ser finas, para que se misturem facilmente com o líquido; não deve sofrer contração após seu endurecimento; não deve manchar a estrutura dentinária; deve ser bacteriostático ou, pelo menos desencorajar o crescimento bacteriano; deve tomar presa lentamente; ser insolúvel frente aos fluidos teciduais; ser bem tolerado pelos tecidos, isto é, não ser irritante para os tecidos periradiculares; ser solúvel aos solventes comuns, caso seja necessária à remoção da obturação do canal. Na tentativa de se obter um cimento obturador ideal os pesquisadores têm-se esforçado e inúmeros estudos tem sido realizados ao longo dos anos.

De acordo com Estrela (2004) e Johnson & Gutman (2007), alguns dos cimentos mais comuns são: o cimento de Rickert, Procosol, U/P-Grossman, cimento de Watch, Tubliseal, Endomethasone, N2, o cimento de Grossman, Endofill, Fillcanal, N-Rickert, Sealapex, Sealer 26, Apexit, AH 26, Diaket, Top Seal, AH Plus e Ketac Endo.

Os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE) têm um histórico de uso bem sucedido, ao longo dos anos. A formulação destes cimentos é composta por ZOE associado a vários aditivos para torná-los radiopacos, antibacterianos e adesivos (Mickel *et al.*, 2003; Saleh *et al.*, 2004). São reabsorvidos se houver extrusão para os tecidos periradiculares (Augsburger & Peters, 1990); exibem atividade antimicrobiana (Barckhordar, 1989; al Kathib *et al.*, 1990; Mickel *et al.*, 2003). Estes cimentos apresentam um tempo de presa longo (Allan *et al.*, 2001), sofrem contração ao tomar presa e são solúveis aos fluidos teciduais (Peters, 1986; Kazemi *et al.*, 1993). Podem ainda manchar a estrutura dentinária (van der Burget & Plasschaert, 1985; Davis *et al.*, 2002).

Os cimentos de Rickert e Grossman são os cimentos obturadores padrão com os quais todos os outros são comparados, por terem sobrevivido ao teste de tempo e utilização. A maioria dos cimentos obturadores disponíveis e utilizados atualmente são variações destas formas originais (Walton & Johnson, 1998; Estrela, 2004).

### **2.3.1 Cimento de Rickert**

O cimento de Rickert ou “Kerr Pulp Canal Sealer” foi introduzido na Endodontia em 1927, tendo sua formulação publicada em 1931. Este cimento vem sendo muito utilizado até os dias atuais e seu uso se consagrou devido às suas propriedades antimicrobianas,

lubrificantes, adesivas, de estabilidade dimensional, tempo de presa, solubilidade, desintegração, fluidez e radiopacidade (Rickert & Dixon 1981; Orstavik, 1983; Nguyen, 1994; Pommel *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores mencionam ainda que este cimento toma presa completamente entre 15 a 30 minutos, reduzindo de maneira significativa as respostas inflamatórias observadas quando da utilização de cimentos que levam de 24 a 36 horas para endurecer. Devido ao seu teor de prata, o cimento de Rickert pode causar alteração de cor do dente e deve ser removido meticulosamente da coroa e da câmara pulpar (Grieve & Parkholm, 1973; McComb & Smith, 1976; Nguyen, 1994; Estrela, 2004). Este cimento também pode ser encontrado como Pulp Canal Sealer EWT (extended work time), possuindo maior tempo de presa.

### **2.3.2 Cimento de Grossman**

O cimento de Grossman surgiu em 1936, com o propósito de fornecer uma pasta que permitisse maior tempo de presa. Com o desenvolvimento das pesquisas, Grossman (1958, 1962 e 1988) modificou e melhorou sua fórmula. Este cimento é, ainda hoje, muito utilizado e produzido por diversas empresas, com os mais diferentes nomes comerciais. Dentre eles, encontramos o ProcoSol na América do Norte e, no Brasil, encontramos, com pequenas modificações da fórmula original, o Endofill, Grosscanal, Pulpfill, Grossman da FROP-USP, Grossman da Inodon, Grosscanal (De Deus, 1992; Estrela, 2004). É largamente utilizado na obturação do SCR e satisfaz a maioria dos requisitos do próprio Grossman para um cimento ideal: sua ação irritante é mínima; apresenta um elevado grau de atividade antimicrobiana; um bom potencial de selamento; pequena alteração volumétrica durante a presa e capacidade de ser absorvido (Kayaoglu *et al.*, 2005; Savioli *et al.*, 2006). Grossman recomendava que seu cimento deveria ser manipulado em uma consistência tal que, ao final, pudesse ser levantado da placa de vidro, por meio de uma espátula, em uma distância de uma polegada, sem se romper (De Deus, 1992; Stock *et al.*, 1996; Walton & Torabinejad, 1997), não devendo ser usadas mais do que três gotas de líquido de cada vez.

## 2.4 Efeitos inflamatórios e citotóxicos de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE)

É amplamente aceito que os cimentos obturadores endodônticos entram em contato com os tecidos periradiculares através dos vários portais de saída do SCR e são irritantes e/ou citotóxicos para estes tecidos. Se os cimentos são forçados através do forame apical e, conseqüentemente para o interior dos tecidos, pode acontecer uma reação de corpo estranho, caracterizada pelo infiltrado de leucócitos, com a presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e outras células da inflamação crônica. Mesmo na situação onde o material obturador endodôntico não é forçado através do forame, a inflamação é observada, pelo menos histologicamente (Langeland *et al.*, 1985; Pascon *et al.*, 1991; Bernath & Szabo, 2003).

A presença do eugenol vem sendo relacionada a uma maior citotoxicidade dos cimentos. Crane *et al.* (1980) demonstraram, em um modelo animal, que um cimento obturador endodôntico “experimental” sem eugenol apresentou alta biocompatibilidade após 96 horas como também após 6 meses de manipulação, quando comparado a outros dois contendo eugenol (Pulp Canal Sealer e Tubliseal).

Por outro lado, Syrjänen *et al.* (1985) relataram que não fica claro se a citotoxicidade observada se deve apenas ao eugenol, uma vez que demonstraram o mesmo nível de toxicidade tanto para o pó quanto para o eugenol presentes no cimento a base de ZOE, Procosol.

Markovitz *et al.* (1992), relataram que, até então, não se sabe se o eugenol contido nos vários cimentos obturadores endodônticos contribui para o processo de cura dos tecidos periradiculares ou se atrasa este processo, promovendo a destruição tecidual e a manutenção da reação inflamatória.

Na literatura, contudo, existem vários relatos de trabalhos realizados *in vitro* demonstrando a citotoxicidade dos cimentos a base de ZOE (Safavi *et al.*, 1989; Spangberg & Langeland, 1973; Hume, 1984; Feiglin, 1987; Briseno & Willershausen, 1990; Makesi *et al.*, 1991; Araki *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 1993; Holland, 1994; Makesi, *et al.* 1996; Bratel *et al.*, 1998; Azar *et al.*, 2000; Sadeghein *et al.*, 2001; Al-Awadhi *et al.*, 2004; Perassi *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2002; de Oliveira Mendes *et al.*, 2003; Bouillaguet *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Melegari *et al.*, 2006) e *in vivo* (Erausquin & Muruzabal, 1967; Orstavik & Mjör, 1988; Yesilsoy *et al.*, 1988; Stewart & Watson, 1990; Pascon *et al.*, 1991; Orstavik & Mjör, 1992;

Pertot *et al.*, 1992; Mittal *et al.*, 1995; Bilginer *et al.*, 1997; Kolokouris *et al.*, 1998; Bernath & Szabo, 2003; Kaplan *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Melegari *et al.*, 2006). Por outro lado, Pertot *et al.* (1992), avaliando a biocompatibilidade de dois cimentos recém manipulados à base de ZOE (Sealite e Pulp Canal Sealer) após implantação em osso mandibular de coelhos, observaram que ambos os cimentos apresentaram boa biocompatibilidade e a reação inflamatória causada por eles, decresceu com o tempo.

Gerosa *et al.* (1995), utilizando fibroblastos gengivais humanos por períodos de até 2 semanas, demonstraram que o Pulp Canal Sealer foi o único cimento considerado de baixa toxicidade durante os períodos de avaliação, quando comparado aos demais: AH26, Rocanal-R2, Rocanal-R3, Bioseal e Endomethasone.

Dentes humanos portadores ou não de lesão periapical quando sobre-obturados, na presença dos cimentos ProcoSol e Roth Elite 801, demonstraram cicatrização dos tecidos periapicais e reabsorção do material obturador extravasado, ao final de um período médio de nove anos de observação (Ausburger & Peters, 1990).

Outro fator importante seria a análise da citotoxicidade destes cimentos em presença de infecção residual. Orstavik & Mjör (1992) demonstraram, em tecidos periapicais de macacos, que as células mais frequentemente encontradas nos tecidos adjacentes ao canal radicular que fora obturado com cimento endodôntico a base de ZOE, foram os macrófagos. Estes autores e outros pesquisadores sugeriram que a persistência da inflamação, após 6 meses do término do tratamento, não deve ser imputada à toxicidade do cimento, mas sim, à presença de infecção remanescente (Lin *et al.*, 1992).

Nos testes de biocompatibilidade dos diferentes materiais obturadores endodôntico, pouca atenção tem sido dada aos efeitos adversos dos mesmos sobre o sistema imune (Bratel *et al.*, 1998).

Makesi *et al.* (1996) estudaram, “*in vitro*”, o processo de engolfamento de cimentos obturadores endodônticos por macrófagos peritoneais de ratos, e demonstraram que houve uma correlação inversa entre a toxicidade e a taxa de fagocitose de macrófagos expostos aos diferentes materiais obturadores endodônticos.

Em um estudo *in vitro*, células imunocompetentes foram expostas a extratos de cimentos endodônticos (AH-26, cimento de Grossman, Endomethasone e Apexit). O cimento de Grossman reduziu significativamente a proliferação de linfócitos T de camundongos, chegando a causar a inibição total da proliferação destas células quando recém manipulado (Bratel *et al.*, 1998).



Por sua vez, de Oliveira Mendes *et al.* (2003) avaliaram “in vitro”, o efeito dos cimentos Pulp Canal Sealer EWT e Endofill, recém manipulados e após a presa, sobre a atividade de macrófagos de camundongos BALB/c. Demonstraram que estes cimentos inibiram de forma semelhante a aderência de macrófagos, a fagocitose e a produção de óxido nítrico. Por outro lado, a produção de IL-12 e a adesão às leveduras não foram afetadas. Concluíram que ambos os cimentos não inibiram uma resposta pró-inflamatória de macrófagos, mas, inibiram respostas efetoras.

Perassi *et al.* (2004) avaliaram a produção de TNF, por macrófagos peritoneais de camundongos, na presença de dois cimentos obturadores endodônticos, Sealapex e Endomethasone. As culturas contendo Sealapex produziram quantidades menores de TNF que aquelas em contato com o Endomethasone.

Sabendo-se que a IL-6 e IL-8 desempenham papel importante na patogênese da inflamação, Huang *et al.* (2005) investigaram os efeitos de um cimento à base de ZOE (N2) e de outro à base de resina (AHPlus) sobre a expressão do mRNA destas citocinas em osteoblastos humanos (células U2OS). Observaram a expressão gênica de mRNA de IL-6 e IL-8, sugerindo ser este um mecanismo utilizado pelos dois cimentos na indução da inflamação periapical.

## **2.5 Efeito de outros materiais utilizados em Endodontia sobre a atividade de macrófagos**

Vários materiais utilizados em Endodontia diminuíram a capacidade de aderência de macrófagos *in vitro*, dentre eles: EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (Segura *et al.*, 1996); hidróxido de cálcio (Segura *et al.*, 1997); hipoclorito de sódio a 5,25% e glutaraldeído a 1% (Jiménez-Rúbio *et al.*, 1997); paramonoclorofenol e paramonoclorofenol canforado (Lhamas *et al.*, 1997); perborato de sódio (Jiménez-Rúbio & Segura, 1998); eugenol (Segura & Jiménez-Rúbio, 1998) e Tifell (formocresol-eugenol) (Segura *et al.*, 1998).

A viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos, incubados na presença de óleo de laranja, eucaliptol e clorofórmio, foi avaliada sendo que o óleo de laranja foi o menos citotóxico deles (Scelza *et al.* 2006).

Recentemente, Rezende *et al.* (2005, 2007) estudaram o efeito de duas marcas comerciais de MTA sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos M1 e M2,

dentre elas a viabilidade, aderência, fagocitose, produção de NO e ROIs como também sobre a produção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10. Estes autores demonstraram que o MTA não afetou nenhuma das atividades destas células.

### **Sistema imune inato**

A primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos são as barreiras físicas e químicas tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos); células NK (*natural killers*); células dendríticas; proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e proteínas denominadas citocinas que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade inata (Abbas & Lichman, 2005). O epitélio proporciona uma barreira física à entrada de microrganismos como também produz uma grande variedade de fatores antimicrobianos. Microrganismos que conseguem romper a barreira epitelial se deparam com macrófagos e outras células que expressam receptores de superfície que reconhecem um vasto número de microrganismos. Estas interações podem estimular a fagocitose de patógenos e a ativação de macrófagos, culminando com a destruição do agente infeccioso e com a indução de resposta inflamatória que recruta outros tipos celulares para o local, incluindo os neutrófilos.

O sistema inato atua também através da produção de citocinas, as quais são importantes reguladoras da qualidade das respostas imunológicas, contribuindo, desta maneira, no combate ao patógeno (Paul, 2003). As citocinas envolvidas no progresso da inflamação são denominadas de citocinas pro-inflamatórias incluindo IL-1, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6, e aquelas que possuem efeito antagônico são comumente denominadas citocinas anti-inflamatórias, dentre elas, a IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Yoshimura *et al.* 2003).

Em poucas horas muitos microrganismos são identificados e destruídos pelas células da imunidade inata, principalmente pelos macrófagos, células dendríticas e células NK (Paul, 2003).

## 2.6 Macrófagos

O sistema de fagócitos mononucleares tem sido definido como uma família de células que tem uma linhagem comum, que se originam da medula óssea, circula no sangue como monócitos e quando estabelecidos nos tecidos, estas células amadurecem e se tornam macrófagos. O fenótipo destes macrófagos depende diretamente do ambiente em que se encontram (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Na ausência de inflamação, o papel principal dos macrófagos é o de remover células mortas e danificadas. No fígado, onde são denominadas de células de Kupffer, removem eritrócitos senescentes, produtos de degradação da fibrina, imunocomplexos como também bactérias. Como macrófagos alveolares eles ingerem e removem partículas inaladas pequenas o suficiente para atingirem as vias aéreas terminais (Janeway *et al.*, 2002). Na presença de inflamação, o nível de migração de monócitos para o sítio de infecção aumenta drasticamente, e o número de macrófagos começa a aumentar em poucas horas, podendo permanecer elevado até a resolução da inflamação.

Durante o processo inflamatório, os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos inflamatórios diferem dos macrófagos residentes especialmente pelo aumento da capacidade fagocítica e pela habilidade aumentada de gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (Fujiwara & Kobayashi, 2005). As citocinas e produtos microbianos afetam diferentemente a função destas células ativando ou desativando-as (Mantovani *et al.*, 2004).

Classicamente, os macrófagos são ativados em resposta a citocina IFN- $\gamma$ , em combinação com o TNF ou com um indutor desta citocina. Por sua vez, parece que a produção de TNF pelo próprio macrófago é considerada mais relevante fisiologicamente, quando ocorre a ligação de receptores do tipo “Toll” a produtos microbianos como o LPS (Hamilton, 2002). Assim, a ativação clássica dos macrófagos seria desenvolvida em resposta a IFN- $\gamma$  juntamente com produtos microbianos como o LPS (Mosser, 2003). A ativação destas células é caracterizada pela alta capacidade de apresentar antígenos às células T; alta produção de IL-12 e IL-23 (Verreck *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, ativação de respostas do tipo Th1; alta produção de radicais intermediários de nitrogênio (NO) e oxigênio (ROIs) no intuito de eliminar microrganismos. Estas células têm sido denominadas de macrófagos M1 provenientes de linhagens de camundongos Th1 (C57BL/6 e B10/A), a exemplo da

nomenclatura dos linfócitos Th1 (Mills, *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003).

Por outro lado, as citocinas IL-4 e IL-13 não inibem simplesmente a ativação de macrófagos, mas induzem um programa distinto de ativação, denominado de “ativação alternativa” (Stein *et al.*, 1992; Gordon, 2003). Macrófagos expostos a estas citocinas falham em produzir NO e são caracterizados pela alta produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e baixa produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12, IL-1, TNF e IL-6. Estas células tem sido denominadas de macrófagos M2, provenientes de linhagens de camundongos Th2 (BALB/c e DBA/2). Estes camundongos não expressam o receptor de IL-12 de alta afinidade (Jones, 1998), predominando assim, a resposta do tipo Th2. Macrófagos M2 foram inicialmente identificados durante o exame de células em que a transcrição de IL-12 foi abolida (Mills *et al.*, 2000).

Os macrófagos M1 e M2 diferem entre si em relação aos receptores, a sua função efetora e a produção de citocinas. Nos macrófagos M1, o metabolismo da arginina é caracterizado por altos níveis de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) resultando na produção de NO e citrulina. O metabolismo da arginina em macrófagos M2 leva a geração de ornitina e ureia apresentando como produto final o colágeno e a proliferação celular (Bogdan, 1991; Mosser *et al.*, 2003; Bronte & Zanovello, 2003). Os receptores e ligantes das citocinas são diferentemente modulados nos macrófagos polarizados. O IFN- $\gamma$  induz seletivamente IP-10 (CXCL10) e MIG (CXCL9) os quais são inibidos pela IL-4 e IL-10 (Watanake *et al.*, 2002). Por outro lado, IL-4 induz seletivamente eotaxin-2 (CCL24), CCL-18 e MDC (CCL22) nos macrófagos e estes efeitos são inibidos por IFN- $\gamma$  (Bonecchi *et al.*, 1998).

De acordo com Bastos *et al.*(2002), Mosser (2003) e Mantovani *et al.* (2004), a polarização M1/M2 é diferenciada pelos níveis constitutivos de IL-12/IL-10. Macrófagos M1 produzem tipicamente altas concentrações de IL-12 e baixas de IL-10, enquanto macrófagos M2 secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 (Verreck, *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2006).

## 2.7 Fagocitose

Classicamente, o reconhecimento da fagocitose se deu graças aos clássicos experimentos de Elie Metchnikov, em 1880. Seus exaustivos estudos o levaram, mais tarde, a propor o conceito da imunidade celular. Este fato, sabidamente importante, tanto no campo biológico quanto no clínico, tem estimulado pesquisas na área imunológica até os dias de hoje (Ambrose, 2006).

Fagocitose é o processo pelo qual uma célula, em particular, engolfa e digere determinado material. A fagocitose é um processo utilizado por vários tipos celulares que vai desde células epiteliais a fibroblastos, e células sanguíneas circulantes do sistema imunológico tais como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, as quais são denominadas de fagócitos profissionais (Rabinovitch, 1995). Este processo é utilizado principalmente por macrófagos e neutrófilos para ingerir partículas estranhas incluindo agentes infecciosos, células senescentes, agregados proteicos, corpos estranhos e debris celulares (Allen & Aderem, 1996).

Sumariamente, a fagocitose pode ser mais bem compreendida de acordo com suas 4 etapas principais. A ligação de partículas a receptores celulares constitui o primeiro passo para a fagocitose. Os fagócitos reconhecem os patógenos por meio de receptores de superfície que podem discriminar entre moléculas de superfície expressa tanto pelos patógenos quanto pelas células do hospedeiro (Greenberg & Silverstein, 1993). A multiplicidade de receptores nos fagócitos e suas interações introduz um alto nível de complexidade ao processo fagocítico. Vários receptores tem sido implicados no processo de fagocitose de microrganismos incluindo os receptores tipo “toll”, os receptores acoplados a proteína G, os receptores Fc e C3, os receptores de citocinas, dentre outros. Este reconhecimento pode ocorrer de maneira direta, através da interação de receptores que reconhecem atributos bioquímicos expressos na superfície do alvo, ou através de processos de opsonização. A opsonização ocorre quando proteínas do hospedeiro, presentes no plasma ou nos fluidos extracelulares, interagem com os patógenos, células apoptóticas ou debris celulares e são reconhecidos por receptores específicos dos fagócitos (Underhill & Ozinsky, 2002).

Na segunda etapa da fagocitose interações receptores-ligantes causam respostas celulares específicas que iniciam a transdução de sinais nos fagócitos, importantes para que ocorram mudanças na membrana e citoesqueleto celulares o que vai levar ao engolfamento

como também a outros aspectos da inflamação como a secreção de enzimas, adesão, degranulação e ativação da explosão respiratória. Suspeita-se hoje que o cálcio, as fosfolipases, as kinases e as GTPases estão diretamente envolvidas nesta sinalização (Desjardins, 2003).

A terceira etapa é o engolimento propriamente dito o que requer um ou mais eventos de fusão de membrana na célula fagocítica para trazer o alvo do meio extracelular para os domínios da vesícula intracelular, denominada fagossoma. É amplamente aceito que a membrana plasmática, através de sua invaginação, é a principal fonte de membrana na formação dos fagossomos, entretanto, uma série de observações indica fontes adicionais de membrana necessárias para este processo (Werb & Cohn, 1972; Vicker, 1977; Muller *et al.*, 1980).

Os fagócitos contêm grânulos chamados lisossomas, que contêm enzimas, proteínas e peptídeos que podem mediar uma resposta microbicida intracelular. A seguir, o fagossoma funde-se com um ou mais lisossomas para gerar o fagolisossoma, onde o conteúdo lisossomal é liberado para destruir o patógeno. Os macrófagos ativados convertem o oxigênio molecular em ROIs e intermediários reativos de nitrogênio, principalmente o óxido nítrico (NO), os quais são altamente reativos na oxidação de agentes que destroem os microrganismos. Estes são considerados os mecanismos microbicidas mais importantes gerados pelos fagócitos profissionais (Espey *et al.*, 2002).

Sendo assim, durante o processo fagocítico, quando os receptores dos fagócitos se engatam com ligantes do seu alvo, sinais intracelulares são gerados não somente para se iniciar o engolfamento, mas também para ativar funções efetoras apropriadas de acordo com as circunstâncias fisiológicas. Durante a inflamação e a infecção, a ligação dos receptores dos fagócitos ativa a degranulação celular, a explosão respiratória e outros caminhos metabólicos levando à geração de mediadores inflamatórios tais como os leucotrienos, as citocinas e também moléculas que participam tanto da resposta imune inata quanto da específica (Brown & Greshan, 2003).

Griffin *et al.* (1976) propuseram um modelo para a fagocitose, denominado “modelo zipper”, que tem guiado muitas pesquisas neste campo. De acordo com esta hipótese, a fagocitose requer repetidas interações entre os ligantes da partícula alvo com receptores na célula fagocítica, interrompendo a formação de novas interações em qualquer ponto da célula, prevenindo, desta maneira, novas ingestões de partículas. Neste modelo, o fagócito move-se sobre a partícula alvo como se fosse um zipper. Todo este processo é dependente de actina. Uma importante característica dos fagócitos é sua habilidade de mudar de forma em resposta

a ativação. O papel da actina nas funções efetoras que requerem o remodelamento da membrana, são dois: primeiramente, o citoesqueleto de actina é que vai suportar mudanças mecânicas na forma. Apesar da força que dirige a extensão e contração da membrana na formação do fagossoma não ter sido ainda elucidado completamente, há evidências que suportam a hipótese de que complexos actina-miosina ou mesmo a polimerização da actina por si só, promovem o motor que direciona tais transformações na membrana. Em segundo lugar, o citoesqueleto de actina regula eventos na transdução de sinais que são importantes para o desenvolvimento do fenótipo efetor. O citoesqueleto age como uma plataforma para trazer receptores de superfície, enzimas “ativáveis”, e seus substratos para bem perto (Brown & Greshan, 2003). Entretanto, esta hipótese permanece controversa, em parte devido às dificuldades encontradas nos trabalhos experimentais.

## 2.8 Óxido Nítrico (NO)

O NO é um mediador crítico de uma variedade de funções biológicas, incluindo relaxamento muscular, agregação plaquetária, neurotransmissão, atividades tumorocidas e microbicidas e imunossupressão (Garcia & Stein, 2006). O NO é um gás solúvel e sua vida média é de poucos segundos, agindo, desta maneira, nas células que se encontram próximas onde este gás é produzido (McMullin *et al.*, 2005). NO é sintetizado a partir da oxidação do por ação da enzima óxido nítrico sintase (Palmer *et al.*, 1988; Celada & Natan, 1994). Esta enzima cataliza a oxidação da amina do grupo guanidina da arginina em NO e citrulina (Pelluso *et al.*, 2004).

Existem três formas de óxido nítrico sintase: as formas endotelial e neuronal, que produzem quantidades necessárias de NO para as funções fisiológicas e a forma induzível (iNOS), de importância imunológica, que foi originalmente descrita em macrófagos (Stuehr & Martella, 1985) porém, tornou-se claro que outros tipos de células também sintetizam NO através da indução da ação da enzima iNOS por citocinas. Em macrófagos murinos, a iNOS é ativada por vários estímulos biológicos, tais como IFN- $\gamma$  (Ding *et al.*, 1988) e TNF- $\alpha$  (Drapier *et al.*, 1988). A associação destas citocinas com baixas concentrações de lipopolissacarídeo (LPS) induz, de maneira dose dependente, a liberação de NO, exercendo citotóxica para microrganismos intracelulares.

Vários trabalhos têm demonstrado que o NO possui uma atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos como os fungos, helmintos, protozoários, leveduras, micobactérias e bactérias. Possui ainda atividade tumoricida e inibitória sobre a replicação viral (Macming *et al.*, 1997; McMullin *et al.*, 2005).

Tem sido também descrito que algumas citocinas regulam negativamente a formação de IFN- $\gamma$  induzida pela enzima iNOS. Dentre elas estão TGF- $\beta$  (Ding *et al.*, 1990; Förstermann *et al.*, 1992), IL-10 (Cunha *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1992) e IL-13 (Matthews & Callard, 1998).

Em algumas situações, o NO pode interagir com radicais intermediários de oxigênio, levando a geração de moléculas que vão potencializar a citotoxicidade contra os microrganismos (Xiomara & Stein, 2006). Entretanto, a produção de NO por macrófagos ativados pode exercer efeito inibitório sobre a produção de ROIs (Jun, *et al.*, 1994).

## 2.9 Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs)

Babior *et al.* (1973) foram os responsáveis pela descoberta da produção de ROIs por fagócitos. Os produtos intermediários de oxigênio gerados pela redução do oxigênio molecular tais como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são denominados radicais intermediários de oxigênio (ROIs). O processo pelo qual os ROIs são produzidos é denominado de explosão respiratória e este processo é iniciado aproximadamente 1 minuto após a exposição de fagócitos ao estímulo (Carlos *et al.*, 2003).

Os ROIs apresentam alta capacidade de atuar como agentes oxidantes que destroem microrganismos (Shiloh *et al.*, 1999). A formação de ROIs pode resultar em danos no DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lípidos num processo denominado stress oxidativo (Espey *et al.*, 2002). Stress oxidativo pode ser melhor definido como um desequilíbrio entre a produção celular de ROIs e os mecanismos antioxidantes de defesa (Geronikaki & Gavalas, 2006).

O superóxido, precursor de outros ROIs, é produto da enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase nos fagócitos (Nathan & Shiloh, 2000). O sistema NADPH oxidase de fagócitos está dormente em células inativas e se torna ativo na membrana fagolisossômica de macrófagos ativados (Forman & Torres, 2002). Este sistema enzimático é composto por várias subunidades, sendo que algumas estão localizadas na membrana



plasmática (gp91phox, e p22phox) e outras no citoplasma (p47phox, p67phox, p40phox e Rac1 ou Rac2). Em macrófagos ativados, a translocação das subunidades do citosol para a membrana fagolisossômica, juntamente com a interação destas proteínas levam a formação da enzima ativa (Nauseef, 2004; Sumimoto *et al.*, 2005).

Vários receptores que reconhecem microrganismos como os receptores tipo “Toll”, os receptores acoplados a proteína G, os receptores Fc e C3 e os receptores de citocinas, atuam cooperativamente para ativar fagócitos a destruir microrganismos ingeridos.

## 2.10 Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF foi originalmente identificado no soro de animais que receberam doses baixas de LPS. O TNF medeia suas atividades pleiotrópicas via dois receptores celulares de superfície, presentes em quase todos os tipos celulares, denominados receptor de TNF tipo I (TNF-R1) e receptor de TNF tipo II (TNF-R2) (Smith *et al.*, 1994). Por possuírem muitas diferenças no domínio transmembrana e citoplasmático, diferentes funções tem sido atribuídas a cada um dos receptores, embora alguma redundância tem sido descrita (Vassali, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993a).

Esta citocina é a principal mediadora da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos.

Os fagócitos mononucleares são a principal fonte celular desta citocina embora os linfócitos T, células NK e mastócitos ativados possam secretá-la. O IFN- $\gamma$ , produzido por células T e NK, aumenta a síntese de TNF por macrófagos estimulados com LPS.

A principal função fisiológica do TNF é recrutar neutrófilos e macrófagos para o local da infecção e ativar estas células para erradicar microrganismos. O TNF, em baixas doses, aumenta a adesividade das células endoteliais, primeiro para neutrófilos e, a seguir para monócitos e linfócitos; ativa neutrófilos; estimula a atividade microbicida dos fagócitos; induz os fagócitos mononucleares a produzir outras citocinas como IL-1, IL-6; coestimula a produção de IL-8 por linfócitos T e a produção de anticorpos por linfócitos B; exerce ação semelhante ao IFN- $\gamma$ , aumentando a expressão do MHC de classe II e potencializa a atividade das células T citotóxicas nas viroses. Além de seu papel na inflamação, o TNF induz apoptose em alguns tipos celulares (Locksley *et al.*, 2001; Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2005). Apesar de exercer atividades benéficas na imunoregulação e na defesa orgânica, podem ser responsáveis

por muitas complicações sistêmicas graves. A produção de TNF em altas doses causa anormalidades sistêmicas, clínicas e patológicas e está diretamente relacionada com alto risco de mortalidade (Garg *et al.*, 2002). O LPS interage com receptores de membrana celular do hospedeiro, ativando sinais intracelulares resultando numa grande produção de citocinas, principalmente o TNF. Este processo pode culminar com a ocorrência do choque séptico (Li *et al.*, 2006).

### **2.11 Interleucina-12 (IL-12)**

A IL-12 é uma citocina importante que exerce função central no início e na regulação das respostas imunes celulares. Esta citocina possui a capacidade de promover a diferenciação de células T naive em Th1, produtoras de IFN- $\gamma$ , as quais são fundamentais para o desenvolvimento da imunidade celular e a resistência contra patógenos (Alber *et al.*, 2006). A IL-12 estimula a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e linfócitos. Através da atividade exercida principalmente sobre as células NK e T, a IL-12 proporciona um importante elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa.

Assim, a IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos quando elas apresentam antígenos para as células T durante as fases indutora e efetora das respostas imunes mediadas por células. A IL-12 acentua as funções citolíticas das células NK ativadas e linfócitos T citolíticos CD8<sup>+</sup>, como também estimula um aumento na produção de anticorpos pelas células B (Metzger *et al.*, 1996). As células B também produzem esta citocina, porém em níveis significativamente menores (D'Andréa *et al.*, 1992). Sua produção é induzida por bactérias, produtos bacterianos, parasitas intracelulares, sendo estimulada pelo IFN- $\gamma$  e CM-CSF e inibida pela IL-10 e IL-4 (Trinchieri & Gerosa, 1996; Koch *et al.*, 1996).

A IL-12 é heterodimérica, composta de duas subunidades p35 e p40, referentes a suas massas moleculares de 40 e 35 kDa respectivamente (Stern *et al.*, 1990), codificadas por genes não relacionados (Sieburth *et al.*, 1992). A expressão de ambas subunidades é requerida para a atividade biológica desta citocina (Gubler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991). A cadeia p40 da IL-12 é compartilhada com outra citocina heterodimérica, a IL-23. A IL-12 e IL-23 também compartilham algumas de suas funções biológicas (Bastos *et al.*, 2004).

### **2.11.1 Camundongos deficientes na cadeia p40 da IL-12 (IL-12/23p40<sup>-/-</sup>)**

De acordo com Mak *et al.* (2001), com o advento da engenharia genética, em 1989, foi possível o desenvolvimento de camundongos “knockout” os quais foram definidos como camundongos deficientes em um gene específico de interesse. Para se determinar o papel fisiológico da IL-12 na resposta imune, camundongos “knockout” para esta citocina foram desenvolvidos. Observou-se que os camundongos deficientes na expressão desta citocina continuaram viáveis e férteis, sem o desenvolvimento de anormalidades. Entretanto, no aspecto imunológico, estes camundongos apresentaram uma capacidade reduzida em produzir respostas do tipo Th1, apresentando uma susceptibilidade aumentada a doenças infecciosas (Mattner *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Bastos *et al.* (2002), demonstraram que macrófagos recuperados de animais IL-12/23p40<sup>-/-</sup>, apresentam um desvio com um perfil do tipo 2. Estes macrófagos denominados M2 apresentam deficiência na produção de NO em resposta ao LPS e IFN- $\gamma$  e produção espontânea de níveis elevados de TGF- $\beta$ . O padrão de ativação assumido por estes macrófagos dos animais deficientes de IL-12 prejudica sua função microbicida, resultando em maior susceptibilidade a parasitas intracelulares.

### **2.12 Interleucina-10 (IL-10)**

A IL-10 é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e, em menor proporção, por linfócitos (Mosmann *et al.*, 1994).

Esta citocina apresenta efeitos pleiotrópicos na inflamação e na imunoregulação (Moore *et al.*, 1993). Vários estudos demonstram que a IL-10 exerce um forte efeito limitante sobre a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T através da supressão da produção de IL-12 pelos macrófagos e células dendríticas, modulando assim as reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células e, conseqüentemente, inibindo a indução e a fase efetora de resposta de células T; regula as células apresentadoras de antígenos, através da inibição de expressão de MHC de classe II; exerce também efeito limitante sobre a produção de mediadores inflamatórios (Fiorentino *et al.*, 1991a; D'Andréa *et al.*, 1993; Poe *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005). A IL-10 promove a proliferação de células B e a

produção de anticorpos (Leonard, 2003). Sendo assim, é um excelente exemplo de *feedback* negativo, atuando nos macrófagos ativados para deprimir suas respostas e direcionar o sistema a seu estado de repouso à medida que a infecção microbiana é irradicada.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito dos cimentos obturadores endodônticos Pulp Canal Sealer EWT® e Endofill® quanto ao seu efeito sobre a atividade dos macrófagos M1 e M2 obtidos da cavidade peritoneal de camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade de macrófagos M1 e M2 cultivados “in vitro” na presença e ausência dos cimentos endodônticos
- Avaliar a capacidade de aderência dos macrófagos M1 e M2 na presença e na ausência dos cimentos endodônticos
- Avaliar a capacidade de fagocitose da levedura *S. boulardii* pelos macrófagos M1 e M2 na presença e na ausência dos cimentos endodônticos
- Avaliar a produção de radicais intermediários de oxigênio pelos macrófagos M1 e M2 na presença e ausência dos cimentos endodônticos
- Avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos M1 e M2 na presença e na ausência dos cimentos endodônticos
- Avaliar a produção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10, pelos macrófagos M1 e M2 na presença e na ausência dos cimentos endodônticos

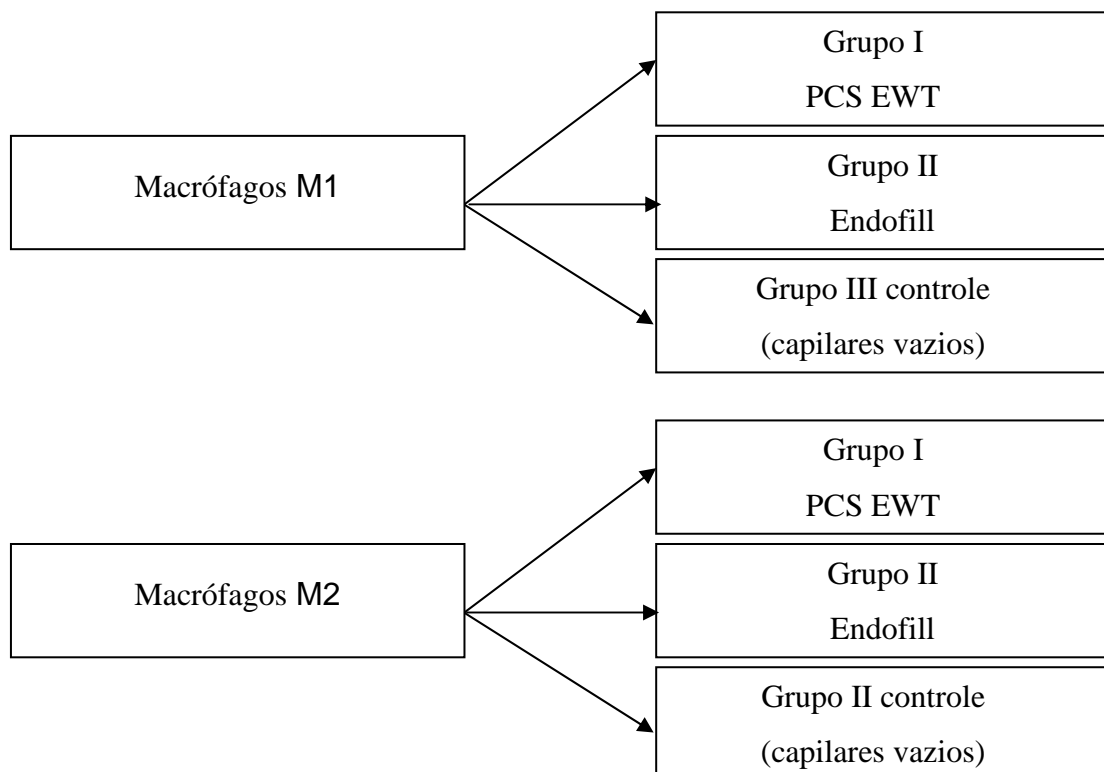
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Abordagem e plano amostral

A atividade fagocítica de macrófagos inflamatórios M1 e M2 provenientes de duas linhagens de camundongos, C57BL/6 e C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>, respectivamente, foi medida pela viabilidade destas células, pela capacidade de aderência, fagocitose de *Saccharomyces boulardii*, produção de radicais Intermediários de oxigênio e óxido nítrico, produção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10, na presença e na ausência dos cimentos obturadores endodônticos Pulp Canal Sealer EWT® (PCS EWT®) e Endofill®.

Constituíram-se três grupos experimentais para cada tipo de macrófago de acordo com o estímulo a que foram submetidos:

- grupo I - capilares contendo Pulp Canal Sealer EWT®
- grupo II - capilares contendo Endofill®
- grupo III - capilares vazios (grupo controle)



Nos experimentos onde avaliou-se a produção de TNF, IL-12 e IL-10, NO e ROIs, os grupos foram subdivididos em expostos e não expostos a diferentes estímulos. Utilizaram-se para cada experimento “pools” celulares de três camundongos e cada experimento foi realizado em triplicata.

## 4.2 Animais e microrganismos

Utilizaram-se camundongos de 4 a 8 semanas, machos ou fêmeas, de duas linhagens, a saber: camundongos C57BL/6 (obtidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais - CE BIO, Belo Horizonte, MG, Brasil) e camundongos C57BL/6IL-12/23p40<sup>-/-</sup> cujas matrizes foram cedidas pelo Dr. Luiz Vicente Rizzo (Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil). Estes animais foram procriados no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Os animais foram mantidos em biotério com barreiras, em gaiolas apropriadas de 20cmx30cmx20cm, com controle de temperatura e luminosidade e, ração e água *ad libitum*. O comitê de ética e pesquisa em animais autorizou o protocolo destes experimentos (CETEA-UFMG nº 122/04).

Os microrganismos utilizados neste estudo foram: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) (cedidos pelo laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil), *Saccharomyces boulardii* (Floratil, Merk S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Zymosam A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).

Caldo BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) enriquecido com 0,05% de L-cisteína (HCL Purex, INALAB, Honolulu, HW, EUA) e 0,5% de extrato de levedura (Bacto<sup>TM</sup> Yest extract, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) foi utilizado para o repique das culturas de *F. nucleatum*. Estas culturas foram incubadas por 48 horas a 37<sup>0</sup>C, em câmara de anaerobiose. O número de bactérias foi obtido pelo grau de absorvância de luz (1D.O.) =  $8 \times 10^8$  células/mL. Após a quantificação, as bactérias foram centrifugadas a 1500xg a 4<sup>0</sup>C, por 10 minutos e ressuspensas em PBS (salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7.4), a fim de obter uma solução com uma concentração de 10<sup>9</sup>

células/mL. Em seguida, foram levadas à autoclave até que a temperatura atingisse 100°C, permanecendo ali por 10 minutos (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). Após a morte dos microrganismos, os frascos foram mantidos sob refrigeração a 4°C. Nos experimentos de mensuração da produção para TNF, IL-12, IL-10, e NO, utilizaram-se o *F. nucleatum* na proporção de 10:1 em relação ao número de macrófagos na cultura.

As culturas de *P. anaerobius* foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) enriquecido com 0,1% de hemina (Sigma Chemical Co.), 0,1% de menadiona (Sigma Chemical Co.) e 0,5% de extrato de levedura (Bacto™ Yest extract, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os procedimentos de incubação, quantificação, produção de antígeno e produção de bactérias, em relação ao número de células utilizadas nas culturas foram utilizados de maneira semelhante ao descrito acima para o *F. nucleatum* (Rezende *et al.*, 2005).

A levedura *S. boulardii* foi ressuspensa em PBS, até se obter a concentração de 10<sup>7</sup> células/mL, que foram mortas pelo calor, em autoclave a 100°C, por 10 minutos, preparadas e armazenadas sob refrigeração, até o momento do experimento. Nos estudos da fagocitose, a proporção do número de leveduras para o número de células na cultura, foi de 10 leveduras, para cada célula da cultura (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003).

O Zimosan A de *S. cerevisiae* foi diluído inicialmente em PBS a fim de realizar-se a contagem do número de partículas em câmara de Neubauer. Após a contagem e determinação da concentração final, diluiu-se, novamente em PBS, até que a solução atingisse uma concentração de 10<sup>9</sup> partículas/mL. Esta solução foi mantida sob refrigeração até o momento de sua utilização. Nos experimentos de mensuração dos ROIs, para estimulação celular, a proporção do número de partículas para o número de células na cultura foi de 10/1 (Trusk *et al.*, 1978).

### 4.3 Cimentos obturadores endodônticos

Utilizaram-se dois cimentos obturadores endodônticos (cimentos de Rickert e Grossman, respectivamente) compostos pelas seguintes fórmulas, de acordo com seus fabricantes:

- Pulp Canal Sealer Extended Work Time (PCS EWT®) (Sybron Dental Specialties, Glendora, CA, EUA), composto por óxido de zinco (32,9%); prata precipitada (21,9%); resina branca (8,2%); resina oleosa (6,0%) e eugenol (21,0%).



- Endofill® (gentilmente cedido pela Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil), composto por óxido de zinco; resina hidrogenada; subcarbonato de bismuto; sulfato de bário; borato de sódio e eugenol e óleo de amêndoas doces.

Para que os cimentos fossem manipulados de acordo com as especificações dos fabricantes, utilizou-se a proporção de 100mg pó / 1 gota de líquido na manipulação do PCS EWT® e 250g pó / 1 gota de líquido na manipulação do Endofill® (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003) A fim de manter as condições de esterilidade, a manipulação foi realizada em fluxo laminar para todas as manipulações.

Os cimentos foram colocados nas extremidades de capilares (Perfecta Indústria e Comércio de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil), previamente cortados e esterilizados. Esta manobra permitiu um contato padronizado dos cimentos com a suspensão celular nas diferentes situações dos experimentos (área do capilar de 3,52 mm<sup>2</sup>).

Para que os cimentos atingissem a presa final, os capilares foram armazenados em placa de cultura de 6 poços estéreis (Nunclo<sup>TM</sup>, Nalge Nunc Internacional, Naperville, IL, EUA) e colocados em estufa a 37°C por três horas. Os grupos controle foram representados por capilares vazios (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003). De acordo com os fabricantes, a presa final do PCS EWT, a 37°C é menor que 2 horas. Em relação ao Endofill, os fabricantes informam somente que seu tempo de trabalho, a 37°C, é de aproximadamente 20 minutos.

#### **4.4 Obtenção e cultura de células peritoneais inflamatórias**

Foram injetados na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup> 2ml de caldo tioglicolato estéril a 3%, (Difco Fluid Thioglycollate Medium, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), a fim de se obterem os macrófagos inflamatórios. Após 5 dias os animais foram sacrificados por decaptação. Para se conseguir o maior conteúdo possível da suspensão celular, foi injetado rapidamente na cavidade peritoneal dos camundongos 10mL de meio RPMI 1640 estéril (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA) com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha 40 x 16 mm e, em seguida removeu-se o maior conteúdo possível com a mesma seringa. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 350 X g a 4°C, Após a centrifugação, realizou-se o descarte do sobrenadante e a ressuspendemos as células em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricel, Campinas, SP, Brasil), 0,1% de solução de β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.)

a 0,05M, 0,2% de gentamicina (Sigma Chemical Co.) 200nM de L-glutamina (Sigma Chemical Co.) (meio completo). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração final foi mantida em  $1 \times 10^5$  cels / mL para a análise da viabilidade celular em placas de 24 poços (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) e para o ensaio de fagocitose;  $1 \times 10^6$  células/mL para a verificação da aderência celular, viabilidade celular em tubo de polipropileno (Corning, Cambridge, MA, EUA) e produção de ROIs, e  $2 \times 10^6$  células/mL para os experimentos de detecção de IL-10, IL-12, TNF e NO. Todas as incubações foram realizadas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

#### 4.5 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade dos macrófagos M1 e M2 frente aos cimentos obturadores endodônticos foi realizada em tubos de polipropileno (Corning) e em placas de 24 poços (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland).

A viabilidade celular em tubos de polipropileno (Corning), foi realizada adicionando-se às suspensões celulares ( $1 \times 10^6$  células/mL), capilares contendo ou não os cimentos endodônticos. Em seguida, as culturas foram levadas à estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 horas, removeram-se 20µL destas suspensões e colocaram-se em tubos eppendorf, juntamente com o mesmo volume de azul de tripan (Sigma Chemical Co.), 0,25% em PBS. Os conteúdos foram analisados em microscópio ótico utilizando câmara de Neubauer. Desta maneira, foram contadas as células vivas e mortas, e os resultados foram expressos em porcentagem.

A viabilidade celular em placas de 24 poços (Techno Plastic Products) foi realizada adicionando-se às suspensões celulares ( $1 \times 10^5$  células/mL) capilares contendo ou não os cimentos endodônticos. Em seguida, estas placas de cultura foram incubadas por 2, 24 e 72 horas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C quando, em seguida, a viabilidade celular foi analisada através de microscópio invertido após o acréscimo de 100µL de solução de azul de tripan (Sigma Chemical Co.) 0,25% em PBS em cada poço. No mínimo 300 células. Os resultados foram expressos em porcentagem (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003).

#### 4.6 Aderência de macrófagos ao substrato

Utilizou-se o método descrito por Lee *et al.* (1993) com pequenas modificações. Após a obtenção das suspensões de macrófagos peritoneais inflamatórios, adicionou-se  $1 \times 10^6$  células / mL em meio completo em tubos de polipropileno estéreis (Corning). Em seguida, adicionaram-se os capilares previamente cortados contendo as amostras de cimentos. Capilares vazios foram utilizados nos tubos controles. Os tubos foram então incubados por 2 horas e, em seguida, foram levados ao vortex por 5 segundos em baixa velocidade. Após a homogeneização, foram removidas alíquotas de 20 $\mu$ L de cada amostra e colocadas em câmaras de Newbauer, armazenadas em placa de Petri umidificadas e novamente incubadas a 37°C por 1 hora. Após este período de incubação, realizou-se, através de microscopia ótica, a contagem dos macrófagos espalhados. O resultado da aderência foi expresso pelo número absoluto de células aderidas. Contaram-se 200 células, selecionadas aleatoriamente, do total de células presentes.

#### 4.7 Fagocitose da levedura *Saccharomyces boulardii* “in vitro”

A técnica descrita por Giaimis *et al.* (1992), com algumas modificações, foi utilizada para se verificar a interferência dos cimentos obturadores endodônticos no processo de fagocitose dos macrófagos M1 e M2. Lamínulas redondas (Glass Técnica Importação e Comércio, Campinas, SP, Brasil) estéreis foram colocadas no fundo dos poços de uma placa de cultura de 24 poços (Techno Plastic Products) e  $1 \times 10^5$  células/mL de suspensão celular em meio completo foram colocadas sobre estas lamínulas. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 2 horas. Em seguida, os meios de cultura foram então removidos e descartados. As células foram lavadas uma vez com RPMI 1640 a 37°C, tendo acrescentado em cada poço, 1 mL de RPMI 1640 a 37°C. Juntamente com os meios de cultura foram adicionados 100 $\mu$ L da suspensão de *S. boulardii*, ( $10^7$  UFC leveduras/mL) mortas pelo calor como também os capilares com ou sem os cimentos. Novamente as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 1h. Em seguida, as leveduras não ligadas foram delicadamente removidas através de três lavagens com meio RPMI 1640, a 37°C. As lamínulas foram

cobertas pelo ácido tânico a 1% (Labsinthy Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) durante 1 minuto. Nova lavagem das células com meio RPMI 1640 foi realizada. A seguir, 1 gota de soro bovino fetal foi colocada sobre cada lamínula a fim de se evitar a cristalização do corante. As lamínulas foram retiradas das placas e após estarem secas, foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, Brasil) como será descrito. Após a coloração e secagem, as lamínulas foram coladas em lâminas com Entellan (MERK S.A., Darmstadt, Germany). Após secagem do Entellan utilizou-se o microscópio ótico num aumento de 100X em imersão para a contagem de: 200 macrófagos, selecionados aleatoriamente, com pelo menos uma levedura associada, onde determinou-se o número de leveduras aderidas e o número de leveduras fagocitadas pelos macrófagos.

#### **4.7.1 Coloração com Panótico Rápido**

A coloração com Panótico Rápido foi realizada através da imersão de cada lamínula durante 5 segundos no Panótico n<sup>o</sup>1, remoção do excesso; imersão, durante 5 segundos no Panótico n<sup>o</sup>2, remoção do excesso; imersão das lamínulas no Panótico n<sup>o</sup>3, também durante 5 segundos. E, finalmente, lavagem em água corrente, para remoção do excesso do corante.

#### **4.7.2 Propriedades corantes das leveduras:**

De acordo com Giaimis *et al.* (1992) as leveduras vivas apresentam-se coradas em azul escuro ou violeta. Por outro lado, as leveduras autoclavadas (mortas pelo calor) exibem a cor rosa claro. No entanto, se estas últimas forem tratadas com ácido tânico imediatamente antes da coloração com Panótico Rápido, exibirão a cor violeta. Estas propriedades corantes podem ser utilizadas na distinção de leveduras extracelulares das intracelulares no experimento de fagocitose. Somente as leveduras extracelulares, as quais são acessíveis à solução de ácido tânico apresentam a cor violeta após a coloração, enquanto as leveduras fagocitadas, permanecem com a cor rosa.

#### 4.8 Produção de Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs)

A mensuração da produção de ROIs por macrófagos M1 e M2 na presença e ausência dos cimentos obturadores foi avaliada através da técnica descrita por Trusk *et al.* (1978), com algumas alterações. Culturas celulares ( $1 \times 10^6$  células/mL) juntamente com os capilares com ou sem os cimentos endodônticos, foram incubadas em tubos de polipropileno estéreis durante 24 horas, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida, estes tubos foram centrifugados a 350xg a 4°C durante 10 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, e as células ressuspendidas em 100µL de RPMI 1640, sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.). O conteúdo dos tubos foi então transferido para placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, New York, EUA), contendo 70µL de RPMI 1640, sem fenol vermelho (Sigma Chemical Co.) em cada poço. No momento da leitura da placa, foram adicionados, por poço,  $10^7$  partículas de zymosan/mL, e 0,05mM de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ptalazinedione) (Sigma Chemical Co.) em RPMI 1640 sem fenol vermelho. Este procedimento mede a quimioluminescência, amplificada pelo luminol, produzida pelo superóxido, radical hidroxila e peróxido de oxigênio em resposta à fagocitose de partículas de zymosan pelos macrófagos. É importante ressaltar que a emissão fraca de luz é observada em associação com a liberação de radicais livres de oxigênio, não podendo ser facilmente utilizada em sistemas de análise, como um meio de mensuração do processo de fagocitose. O luminol amplifica a produção de luz, interagindo com os ROIS produzindo maior intensidade luminosa com um pico de comprimento de onda de aproximadamente 425nm. As placas foram levadas ao luminômetro (LumiCount Packard Instrument Company Inc., Downers Grove, IL, EUA) e realizadas leituras de 2 em 2 minutos durante 1 hora.

Os resultados foram expressos através da área sob cada curva obtida no período de 1 hora, calculada da seguinte maneira:

$$I = h [f_2 + f_3 + \dots + f_{(n-1)}] + (f_1 + f_n) h/2$$

I = área abaixo da curva

h = intervalo de tempo

f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub>, ..., f<sub>n</sub> = unidade de luz nos tempos 1, 2, ..., n (última)

#### 4.9 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

Para se avaliar a produção de NO por macrófagos M1 e M2 frente aos cimentos obturadores endodônticos, foram adicionados às placas de 24 poços (Techno Plastic Products), 1ml de suspensão celular contendo  $2 \times 10^6$  células/mL acrescidas das preparações de *F. nucleatum* e de *P. anaerobius* ( $10^7$  UFC/mL), com e sem 10U/ml de IFN- $\gamma$  recombinante (Pharmingem, San Diego, CA, EUA), além dos capilares, contendo ou não os cimentos obturadores endodônticos. Após o período de incubação de 72 horas, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e a presença de nitritos nos sobrenadantes foi avaliada, conforme método descrito por Green *et al.* (1982), com algumas adaptações. Em resumo, 50 $\mu$ L dos sobrenadantes de cultura foram colocados em placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, New York, EUA). Nos poços em branco e nos poços da curva padrão foram colocados 50 $\mu$ L de RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.). A seguir, 100 $\mu$ L de solução estoque de NaNO<sub>2</sub> a 100 $\mu$ M, previamente diluídos 1:200, foram adicionados nos primeiros poços da curva padrão, e então foram realizadas diluições sucessivas de 1:2, nos poços seguintes. Finalmente, foram adicionados aos poços 100 $\mu$ L de uma mistura de sulfanilamida a 1%, em ácido fosfórico 2,5%, e naftidiletlenodiamina (Sigma Chemical Co.) 1%, em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 540nm. A quantidade de nitrito foi calculada, usando-se uma curva-padrão de nitrito de sódio. Amplitude de detecção: 125 $\mu$ M a 0,977 $\mu$ M.

#### 4.10 Produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Placas de cultura de 24 poços (Techno Plastic Products) foram utilizadas para a colocação de 1mL de suspensão celular contendo  $2 \times 10^6$  células/mL por poço, acrescidas das preparações de *F. nucleatum* e de *P. anaerobius* ( $10^7$  UFC/mL) com e sem 10U/mL de IFN- $\gamma$  recombinante (Pharmingem), além dos capilares, contendo ou não os cimentos obturadores endodônticos. Após um período de incubação de 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e, a seguir, foram realizadas as leituras,

utilizando-se os kits Duo Set Elisa TNF (Development System R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A técnica realizada, proposta pelo fabricante é: sensibilização das placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc Internacional) com 100µL de anticorpo de captura na concentração de (0,8µg/ml), reconstituído em PBS (8g/l de NaCl; 0,2g/l de KCl; 1,15g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em pH 7,2 a 7,4) e incubação destas placas por 12-18 horas, em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes (300µl/poço) em PBS Tween 20, 0,05% (Sigma Chemical Co.), pH 7,2 a 7,4. Em seguida, bloqueram-se as placas com 300µl de reagente diluente (PBS + 1% albumina bovina, pH 7,2 a 7,4) (Sigma Chemical Co.) e aguardaram-se por 1 hora em temperatura ambiente. As placas então foram novamente lavadas por três vezes, conforme descrito acima. O padrão de TNF, reconstituído em reagente diluente, foi colocado nos dois primeiros poços (concentração de 2000 pg/mL) e, nos poços seguintes, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2. Na sequência, foram acrescentados 100µL dos sobrenadantes enquanto 100µL de reagente diluente acrescido de meio RPMI 1640 foram acrescentados nos poços em branco. As placas foram então incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas por três vezes, conforme descrito acima e, 100µL do anticorpo de detecção (150ng/mL), reconstituído em reagente diluente foi adicionado aos poços. Novamente as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e então lavadas por três vezes. A seguir, foi acrescentado aos poços, 100µL de estreptavidina, conjugada com peroxidase, em reagente diluente (50µL de estreptoavidina 1/200 em 10mL de reagente diluente). As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente por um período de 20 minutos. As placas foram novamente lavadas por três vezes sendo adicionados aos poços 100µL de solução de substrato (4mg de OPD em 10 mL de tampão citrato-fosfato, 13,41g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,19g/l de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> em pH 5,0) e 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, cobertas por papel alumínio por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50µL da solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N) em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Corporation) no comprimento de onda de 492 nm. Sensibilidade: 43,1pg/ml.

#### 4.11 Produção de Interleucina-12 (IL-12)

A dosagem da produção de IL-12 foi realizada de forma semelhante à dosagem de TNF utilizando-se Kits Duo Set Elisa IL-12p70 (Development System R&D Systems). Cem microlitros de anticorpo de captura (720 $\mu$ g/mL) na concentração de 4 $\mu$ g/mL reconstituído em PBS (8g/l de NaCl; 0,2g/l de KCl; 1,15g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em pH 7,2 a 7,4) foram utilizados como revestimento das placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International). As placas foram incubadas por 12-18h, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas por três vezes (300 $\mu$ L/poço) em PBS Tween 20, 0,05% (Sigma Chemical Co.), pH 7,2 a 7,4. Bloquearam-se as placas com 300 $\mu$ L de reagente diluente (PBS+ 1%BSA, pH 7,2 a 7,4) por 1h, à temperatura ambiente. Em seguida, lavaram-se as placas por três vezes conforme descrito acima. O padrão de IL-12, reconstituído em reagente diluente, foi colocado nos dois primeiros poços, em uma concentração de 2500pg/mL, tendo sido realizadas diluições sucessivas de 1:2. Na sequência, foram acrescentados 100 $\mu$ L dos sobrenadantes a serem analisados e, nos poços em branco, acrescentou-se 100 $\mu$ L de reagente diluente acrescido de meio RPMI 1640. Neste momento as placas foram incubadas por mais 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram novamente lavadas por três vezes, e 100 $\mu$ L do anticorpo de detecção (72 $\mu$ g/mL) em reagente diluente foi colocado em cada poço. As placas foram incubadas por 2h em temperatura ambiente e, em seguida, foram lavadas por três vezes. Adicionaram-se 100 $\mu$ L/poço de estreptavidina, conjugada com peroxidase em reagente diluente (50 $\mu$ L de estreptoavidina 1/200 em 10mL de reagente diluente), cobrindo-se as placas com papel alumínio e as mantendo por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes como descrito anteriormente e adicionados aos poços 100 $\mu$ L de solução do substrato (4mg de OPD em 10 mL de tampão citrato-fosfato, 13,41g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,19g/l de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> em pH 5,0) e 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, cobertas por papel alumínio por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50 $\mu$ L da solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N) em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Corporation) no comprimento de onda de 492 nm. Sensibilidade: 29,7pg/ml.



#### 4.12 Produção de Interleucina-10 (IL-10)

A produção de IL-10 foi analisada de forma semelhante à das outras citocinas quantificadas, utilizando-se os kits Duo Set Elisa IL-10 (Development System R&D Systems). 100µL de anticorpo de captura (360µg/mL) na concentração de 2µg/mL reconstituído em PBS (8g/l de NaCl; 0,2g/l de KCl; 1,15g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em pH 7,2 a 7,4) foi utilizado como revestimento das placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International). As placas foram então incubadas por 12-18h, em temperatura ambiente. Foram lavadas por três vezes (300µL/poço) em PBS Tween 20, 0,05% (Sigma Chemical Co.), pH 7,2 a 7,4. O bloqueio foi realizado utilizando-se 300µL de reagente diluente (PBS+ 1% albumina bovina, pH 7,2 a 7,4) por 1h, em temperatura ambiente. Realizaram-se nova lavagem das placas por três vezes. O padrão de IL-10 foi colocado nos dois primeiros poços, estando eles em uma concentração de 2000pg/mL. Nos poços seguintes foram realizadas diluições sucessivas de 1:2. Na seqüência, 100µL dos sobrenadantes a serem analisados foram colocados de acordo com o “layout” da placa enquanto 100µL de reagente diluente acrescido de meio RPMI 1640, foram acrescentados nos poços em branco. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Seguiram-se novas lavagens das placas, e 100µL do anticorpo de detecção (72µl/mL) em reagente diluente foi colocado em cada poço, sendo mantidas em temperatura ambiente por 2h. As placas foram lavadas por mais três vezes e 100µL/poço de estreptavidina, conjugada com peroxidase em reagente diluente (50µL de estreptoavidina 1/200 em 10mL de reagente diluente) foi adicionado. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavaram-se novamente por três vezes, conforme já descrito. Na seqüência, foram adicionados aos poços 100µL de solução do substrato (4mg de OPD em 10 mL de tampão citrato-fosfato, 13,41g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,19g/l de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> em pH 5,0) e 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Encobriram-se as placas com papel alumínio e incubaram-se por mais 30 minutos quando esta reação interrompeu-se, adicionando-se 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Corporation) no comprimento de onda de 492 nm. Sensibilidade: 25,9pg/ml.

#### 4.13 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se um software SPSS 12 Inc. (Statistical Package for Social Sciences). Os dados obtidos foram submetidos primeiramente a um teste de homogeneidade de variância (teste de Levene) e a um teste de normalidade (Shapiro Wilk). Quando os dados apresentavam homogeneidade de variância e distribuição normal, utilizou-se o teste t de Student (teste paramétrico). No caso de ausência de normalidade e homocedasticidade, utilizou-se o Mann-Whitney (teste não paramétrico). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Viabilidade celular**

Com o intuito de verificar se os cimentos obturadores endodônticos Pulp Canal Sealer EWT® (PCS EWT®) e Endofill®, seriam citotóxicos para os macrófagos peritoneais M1 e M2, provenientes de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>, respectivamente, realizaram-se o estudo da viabilidade celular em placa de 24 poços e em tubo de polipropileno.

#### **5.1.1 Viabilidade em placa de 24 poços**

A viabilidade celular em placas de 24 poços foi determinada após incubação de  $1 \times 10^5$  células/mL por 2, 24 e 72 horas. Estas condições são aquelas que foram utilizadas nos experimentos de fagocitose, produção de NO e das citocinas TNF, IL-12 e IL-10. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se a técnica de exclusão de azul de tripan. Os resultados, podem ser vistos nos Gráficos 1 e 2 que demonstram que a viabilidade celular foi superior a 95% em todos os casos.

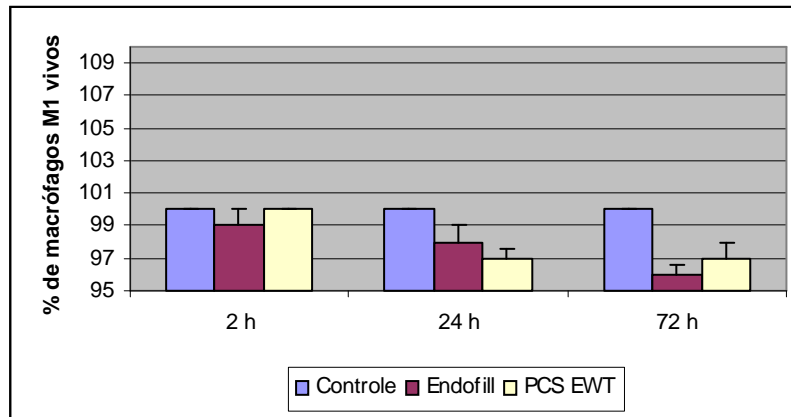


Gráfico 1- Viabilidade de macrófagos M1, recuperados de camundongos C57BL/6 (expressa em porcentagem), em placas de 24 poços, após 2, 24 e 72 horas de incubação de  $1 \times 10^5$  células/mL, na presença e ausência dos cimentos endodônticos. O resultado é representativo da média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão.

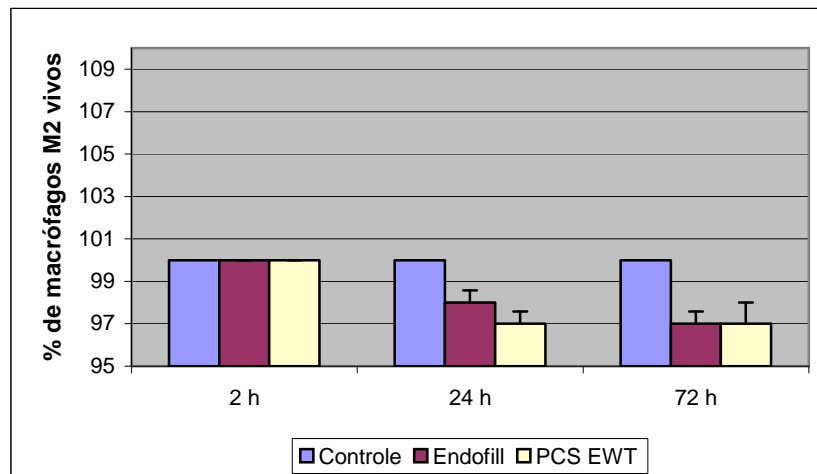


Gráfico 2- Viabilidade de macrófagos M2, recuperados de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup> (expressa em porcentagem), em placas de 24 poços, após 2, 24 e 72 horas de incubação de  $1 \times 10^5$  células/mL, na presença e ausência dos cimentos endodônticos. O resultado é representativo da média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão.

### 5.1.2 Viabilidade em tubos de polipropileno

A viabilidade celular em tubos de polipropileno foi determinada após incubação de  $1 \times 10^6$  células/ml por 2 e 24 horas. Estas condições são aquelas que foram utilizadas nos

experimentos de aderência e produção de ROIs. A viabilidade celular foi realizada através da utilização da técnica de exclusão de azul de tripan. Os resultados estão expressos nos Gráficos 3 e 4 onde constata-se que a viabilidade foi superior a 96% em todos os casos.

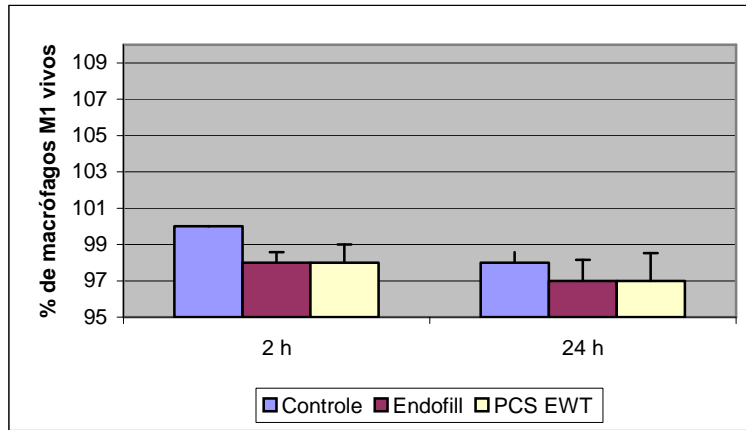


Gráfico 3- Viabilidade de macrófagos M1, recuperados de camundongos C57BL/6 (expressa em porcentagem), em tubos de polipropileno, após 2 e 24 horas de incubação de  $1 \times 10^6$  células/ mL, na presença e ausência dos cimentos obturadores endodônticos. O resultado é representativo da média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão.

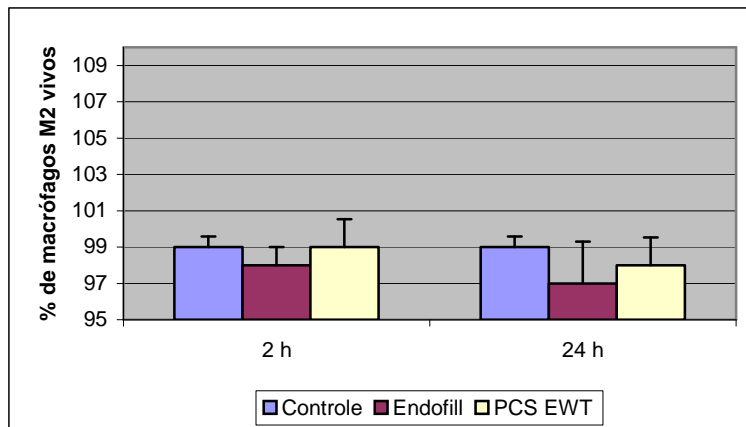


Gráfico 4- Viabilidade de macrófagos M2, recuperados de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup> (expressa em porcentagem), em tubos de polipropileno, após 2 e 24 horas de incubação de  $1 \times 10^6$  células/mL, na presença e ausência dos cimentos obturadores endodônticos. O resultado é representativo da média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão.

## 5.2 Aderência de macrófagos ao substrato

Avaliou-se, *in vitro*, o efeito dos cimentos obturadores endodônticos na aderência de macrófagos M1 e M2 ao vidro. Os resultados estão apresentados no Gráfico 5. A pré-incubação com os cimentos Endofill e PCS EWT inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a aderência de macrófagos M1 e M2, quando comparados com o grupo controle, sem cimento. Os resultados estão expressos como o número absoluto de células aderidas. Contaram-se 200 células, selecionadas aleatoriamente, do total das células presentes.

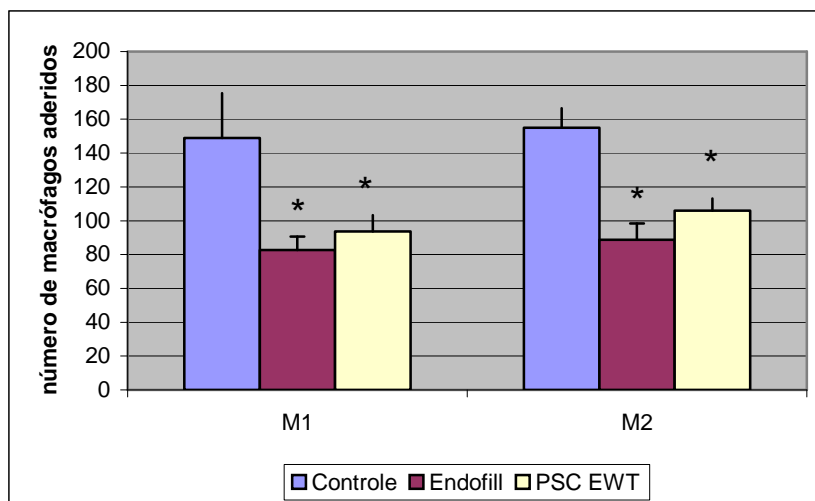


Gráfico 5 – Aderência ao vidro de macrófagos M1, recuperados de camundongos C57BL/6, e de macrófagos M2, recuperados de camundongos C57BL/6IL-12/23p40<sup>-/-</sup> na presença e ausência dos cimentos obturadores endodônticos. Os macrófagos aderidos e não aderidos foram contados após 2 horas de incubação e os resultados estão expressos como o número absoluto de células aderidas. O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student).

## 5.3 Fagocitose da levedura *S.bouardii* por macrófagos inflamatórios M1 e M2

Fagocitose é o processo que compreende aderência, engolfamento e digestão de determinada partícula, dependente do reconhecimento de receptores celulares de superfície, com a subsequente formação de extensões membranosas ricas em actina ao redor da partícula,

formação de fagossoma e sua maturação em fagolisossoma cuja finalidade é a destruição do agente fagocitado (Brown & Greshan, 2003). A fim de verificar, *in vitro*, o efeito dos cimentos Endofill e PCS EWT sobre a fagocitose de macrófagos M1 e M2, colocou-se a levedura *S. boulardii* em contato com estas células juntamente com os capilares contendo e não os cimentos. Os resultados estão expressos nos Gráficos 6 e 7. Apesar de encontrarmos um número variável de leveduras aderidas aos dois tipos celulares, nenhuma diferença significativa foi encontrada. No gráfico 6 verifica-se que somente o grupo tratado com PCS EWT inibiu a taxa de fagocitose de macrófagos M1, quando comparada com o grupo controle (sem cimento) ( $p < 0,05$ ). Por sua vez, a fagocitose de *S. boulardii* por macrófagos M2 foi prejudicada na presença de ambos os cimentos endodônticos ( $p < 0,05$ ) (Gráfico7). Estes resultados demonstram ainda que, comparando os grupos controle (sem cimento), os macrófagos M2 apresentaram um índice estatisticamente significativo maior de fagocitose, que o grupo de macrófagos M1 ( $p < 0,05$ ). Contaram-se 200 células com levedura associada, selecionadas aleatoriamente, do total das células presentes. Os resultados estão expressos como o número de leveduras aderidas ou fagocitadas pelos macrófagos.

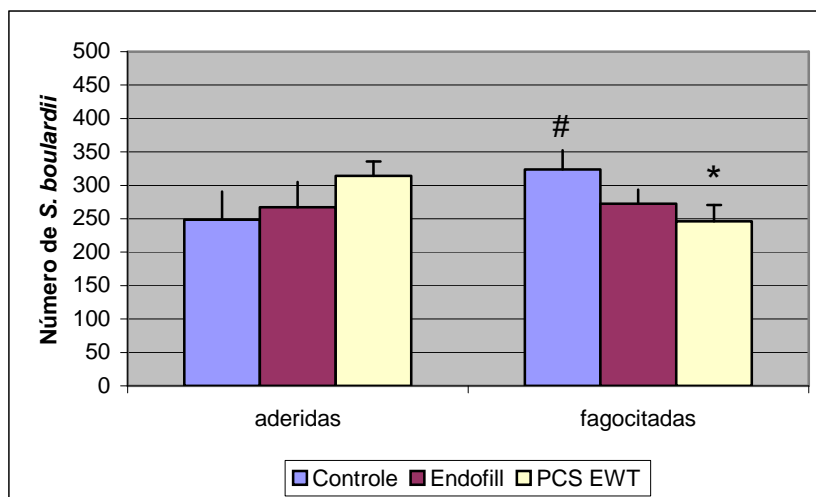


Gráfico 6 – Adesão e fagocitose de *S. boulardii* por macrófagos M1, recuperados de camundongos C57BL/6, após 2 horas de incubação na presença e ausência (controle) dos cimentos obturadores endodônticos (expressos como o número de leveduras aderidas ou fagocitadas por macrófago). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Teste *t* de Student).

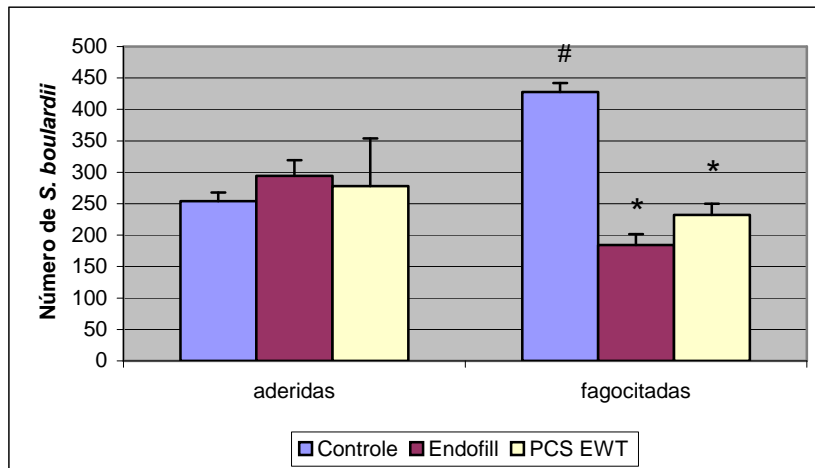


Gráfico 7 - Aderência e fagocitose de *S. boulardii* por macrófagos M2, recuperados de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>, após 2 horas de incubação na presença e ausência (controle) dos cimentos obturadores endodônticos (expressos como o número de leveduras aderidas ou fagocitadas por macrófago). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Teste *t* de Student).

#### 5.4 Produção de Radicais Intermediários de Oxigênio (ROIs)

Os ROIs apresentam alta capacidade de atuar como agentes oxidantes. Desta maneira, sua produção torna-se um mecanismo importante de eliminação de microrganismos fagocitados. A produção de ROIs também é denominada de explosão respiratória (Shiloh *et al.*, 1999; Carlos *et al.*, 2003). Observou-se que os macrófagos M1 produziram níveis significativamente maiores de ROIs que os macrófagos M2, tanto em relação a produção basal quanto em relação a estimulada por zymosan ( $p < 0,05$ ) (Gráficos 8 e 9). A pré-incubação com ambos os cimentos, inibiu a produção basal de ROIs pelos macrófagos M1 ( $p < 0,05$ ). A explosão respiratória que ocorreu nos macrófagos M1 estimulada com zymosan foi drasticamente afetada por ambos Endofill e PCS EWT ( $p < 0,05$ ). PCS EWT inibiu significativamente a produção basal de ROIs por macrófagos M2.



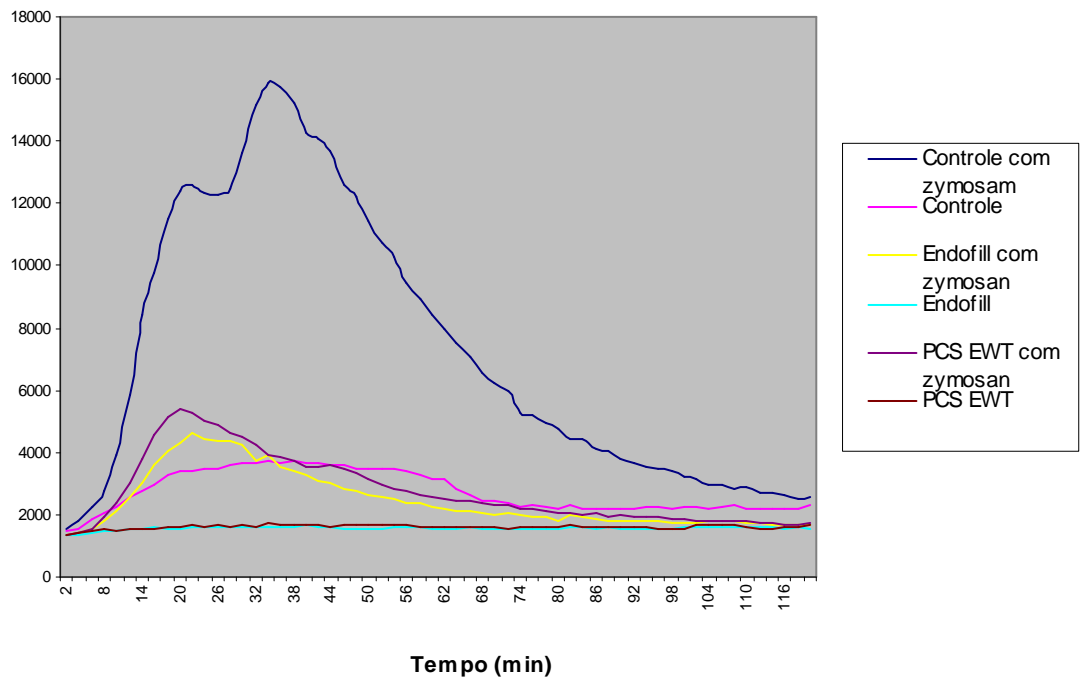


Gráfico 8 - Cinética de produção de ROIs por macrófagos M1 recuperados de camundongos C57BL/6. As células foram cultivadas na presença de capilares contendo os cimentos e capilares vazios (controle) por 24 horas, estimuladas e não com  $10^7$  partículas de zymosan/mL. O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata.

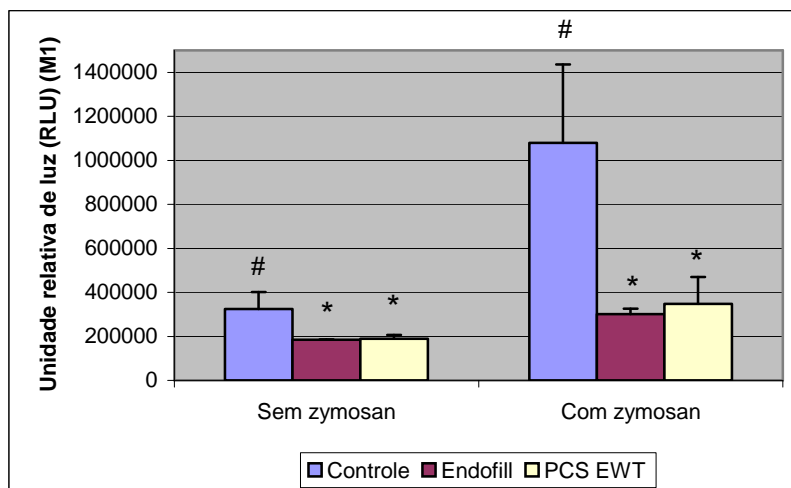


Gráfico 9 - Produção total de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva), por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6. As células foram cultivadas na presença de capilares vazios (controle) e contendo os cimentos, por 24 horas, estimuladas e não com  $10^7$  partículas de zymosan/mL. O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença

estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste  $t$  de Student e Mann-Whitney). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney).

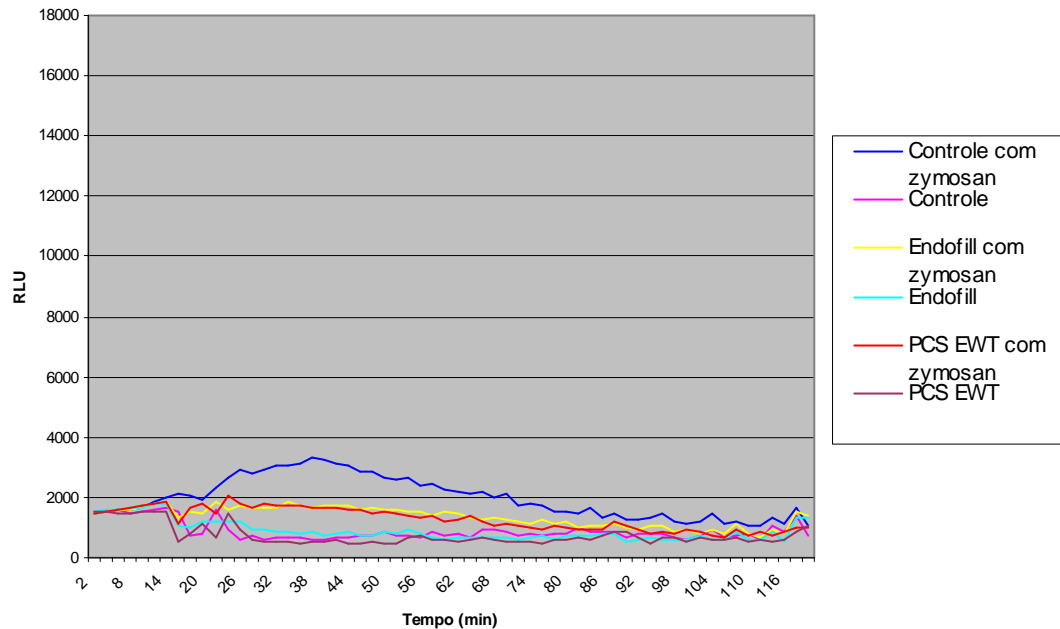


Gráfico 10 – Cinética de produção de ROIs por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>. As células foram cultivadas na presença de capilares contendo os cimentos e capilares vazios (controle) por 24 horas, estimuladas e não com  $10^7$  partículas de zymosan/ml. O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata.

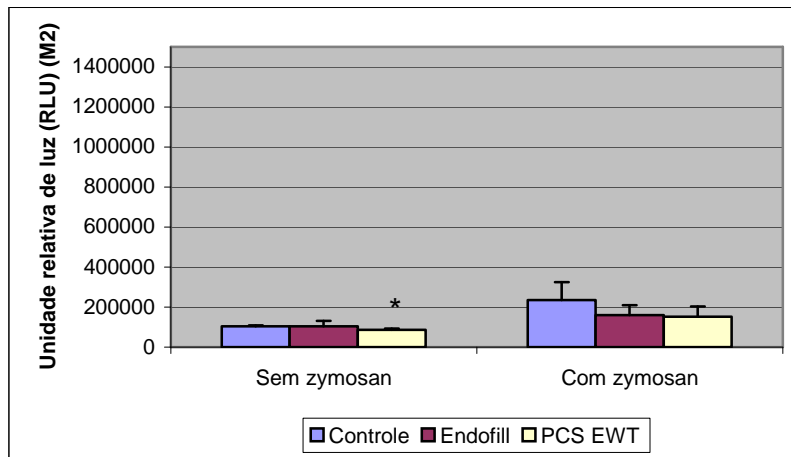


Gráfico 11 – Produção total de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva) por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>. As células foram cultivadas na presença de capilares contendo os cimentos e capilares vazios (controle) por 24 horas, estimuladas e não com 10<sup>7</sup> partículas de zymosan/ml. O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento (p<0,05) (Teste *t* de Student). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney).

## 5.5 Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO é um importante mecanismo de eliminação de microrganismos fagocitados. Devido as suas propriedades citotóxicas e por ser frequentemente gerado por macrófagos ativados, o NO exerce importante papel na imunidade inata (Garcia & Stein, 2006). Para se avaliar estes parâmetros estimularam-se macrófagos em cultura (M1 e M2) com *Fusobacterium nucleatum* (Gram -), acrescida e não de IFN- $\gamma$ , com *Peptostreptococcus anaerobius* (Gram+), acrescida e não de IFN- $\gamma$ , na presença e ausência dos cimentos Endofill e PCS EWT. Os resultados estão expressos nos Gráficos 12, 13, 14 e 15. *F. nucleatum* induziu, de forma similar, a produção de NO por macrófagos M1 e M2 nos grupos controle (sem cimento) (gráficos 12 e 14). Com a adição de IFN- $\gamma$  a estas culturas pode-se observar que os macrófagos M1 produziram mais NO em resposta ao *F. nucleatum* (gráficos 12 e 13). Comparando-se ainda os grupos controle (sem cimento), observou-se que os macrófagos M1, quando estimulados com *F. nucleatum* na presença de IFN- $\gamma$ , apresentaram um índice

estatisticamente significativo maior de produção de NO que o grupo de macrófagos M2 ( $p < 0,05$ ).

Os cimentos endodônticos não alteraram a produção de óxido nítrico por macrófagos M1, mesmo na presença dos diferentes estímulos (gráficos 12 e 14). A produção de NO, por macrófagos M2, estimulada por *F. nucleatum*, e por *F. nucleatum* mais IFN- $\gamma$ , foi prejudicada por ambos os cimentos Endofill e PCS EWT (Gráfico 13). *P. anaerobius* não induziu, por si só, a produção de NO pelas células M1 e M2 nos grupos controle (sem cimento), mas o fez na presença de IFN- $\gamma$  (gráficos 14 e 15). Observou-se que a produção de NO, por macrófagos M2, estimulados por *P. anaerobius* na presença e ausência de IFN- $\gamma$ , não foi afetada na presença dos cimentos (Gráfico 15).

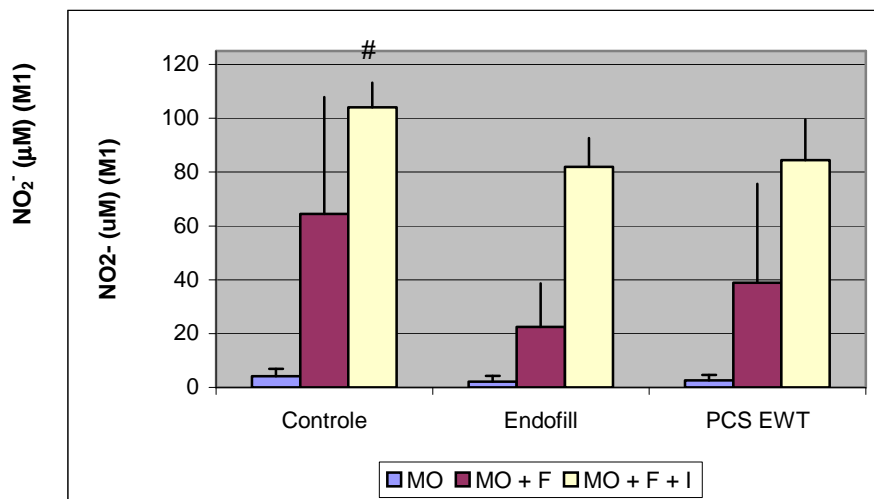


Gráfico 12 - Produção de óxido nítrico ( $\text{NO}_2^-$ ) por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6. Os macrófagos foram cultivados na presença de capilares vazios (controle) e de capilares contendo os cimentos endodônticos Endofill e PCS EWT por 72 horas, estimulados e não com *F. nucleatum* (F), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão. # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney). Amplitude de detecção: 125 $\mu\text{M}$  a 0,977 $\mu\text{M}$ .

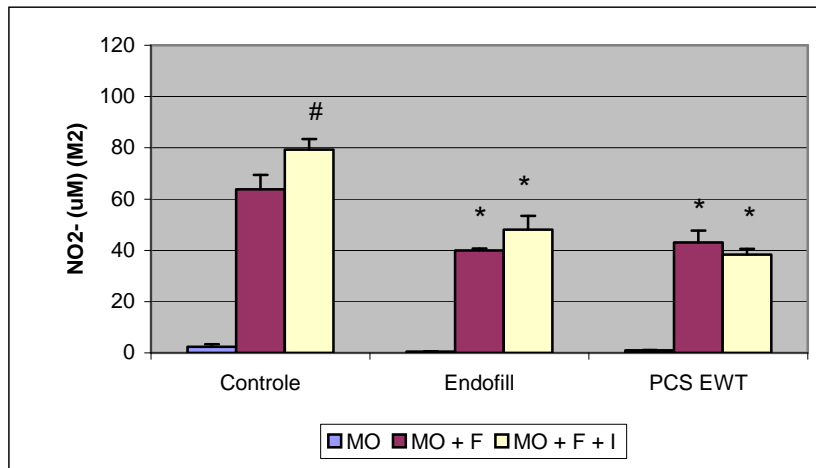


Gráfico 13 - Produção de óxido nítrico ( $\text{NO}_2^-$ ) por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>. Os macrófagos foram cultivados na presença de capilares vazios (controle) e de capilares contendo os cimentos endodônticos Endofill e PCS EWT por 72 horas, estimulados e não com *F. nucleatum* (F), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student e Mann-Whitney). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney). Amplitude de detecção: 125 $\mu\text{M}$  a 0,977 $\mu\text{M}$ ).

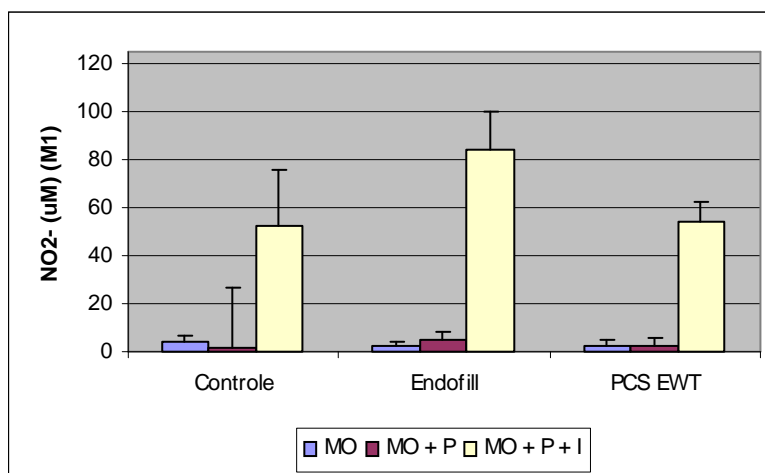


Gráfico 14 - Produção de óxido nítrico ( $\text{NO}_2^-$ ) por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6. Os macrófagos foram cultivados na presença de capilares vazios (controle) e de capilares contendo os cimentos endodônticos, Endofill e PCS EWT, por 72 horas, estimulados e não com *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão. Sensibilidade: 125 $\mu\text{M}$  a 0,977 $\mu\text{M}$ ).

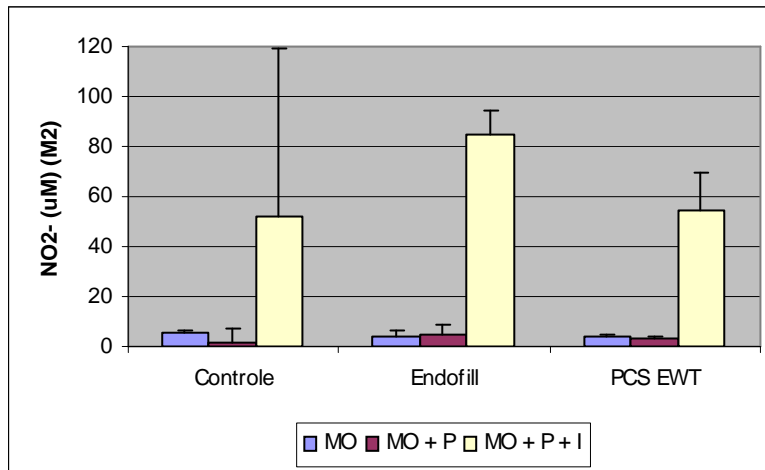


Gráfico 15 - Produção de óxido nítrico ( $\text{NO}_2^-$ ) por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>. Os macrófagos foram cultivados na presença de capilares vazios (controle) e de capilares contendo os cimentos endodônticos Endofill e PCS EWT, por 72 horas, estimulados e não com *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão. Sensibilidade: 125 $\mu\text{M}$  a 0,977 $\mu\text{M}$ .

## 5.6 Produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. A principal função fisiológica do TNF é recrutar neutrófilos e macrófagos para o local da infecção e ativar estas células para erradicar microrganismos (Locksley *et al.*, 2001). Entretanto, esta citocina pode ser responsável por muitas complicações sistêmicas graves (Li *et al.*, 2006). A produção desta citocina, na ausência e/ou presença dos cimentos endodônticos foi avaliada em cultura de macrófagos M1 e M2, estimulada e não com o *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), na presença e ausência de IFN- $\gamma$  (I). Os resultados estão expressos nos Gráficos 16 e 17. Tanto os macrófagos inflamatórios M1 quanto M2 produziram TNF- $\alpha$  na ausência de estímulo bacteriano. A produção de TNF- $\alpha$  estimulada por *F. nucleatum* por macrófagos M1 foi prejudicada pela presença do PCS EWT®. Entretanto, a pré-incubação tanto com PCS EWT® quanto com Endofill® interferiu com a produção desta citocina pelos macrófagos M1 quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ . A produção de TNF- $\alpha$  estimulada com *F. nucleatum* na presença de IFN- $\gamma$ , por macrófagos M2, foi prejudicada pela

presença de ambos os cimentos. Por outro lado, a produção desta citocina por macrófagos M2 foi prejudicada somente pelo Endofill quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ . Os resultados demonstram ainda que, comparando-se os grupos não tratados com cimento (grupos controle), os macrófagos M1, quando estimulados com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ , apresentaram um índice estatisticamente significativo maior de produção desta citocina, que o grupo de macrófagos M2 ( $p < 0,05$ ).

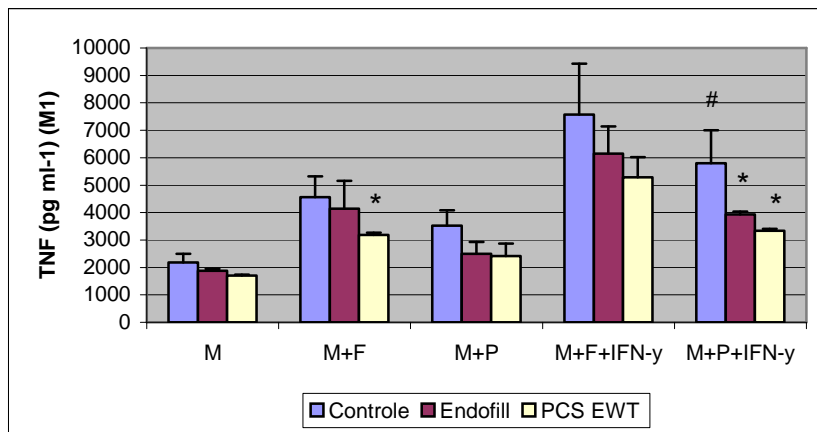


Gráfico 16- Produção de TNF por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6, após 24 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos obturadores endodônticos Endofill e PCS EWT estimulados e não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student e Mann-Whitney). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney) Sensibilidade: 43,1pg/ml.

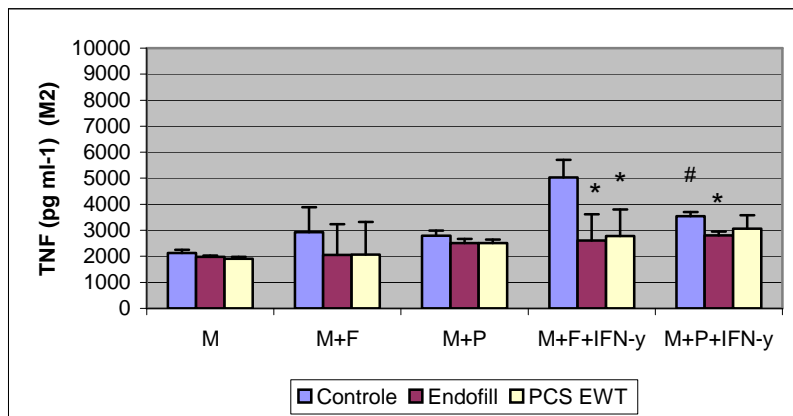


Gráfico 17- Produção de TNF por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12p40<sup>-/-</sup>, após 24 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos obturadores endodônticos Endofill e PCS EWT estimulados e não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Mann-Whitney). Sensibilidade: 43,1pg/ml.

### 5.7 Produção de Interleucina-12 (IL-12)

A IL-12 é uma citocina heterodimérica que desempenha o papel central na polarização dos linfócitos T helper (Th) para o subtipo Th1 (Gately *et al.*, 1998), interligando a resposta imune inata à adaptativa. É produzida pela ativação de monócitos e células dendríticas (Rogge *et al.*, 1997). Avaliou-se em cultura a produção desta citocina por macrófagos M1 estimulados e não com *Fusobacterium nucleatum* (F), *Peptostreptococcus anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I), na presença e ausência dos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais. A produção de IL-12p70 não foi detectada em cultura na ausência de estímulo bacteriano. Nenhum dos cimentos obturadores endodônticos interferiu com a produção desta citocina pelos macrófagos M1 estimulados e não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), na presença ou ausência de IFN- $\gamma$  (I) (Gráfico 18).

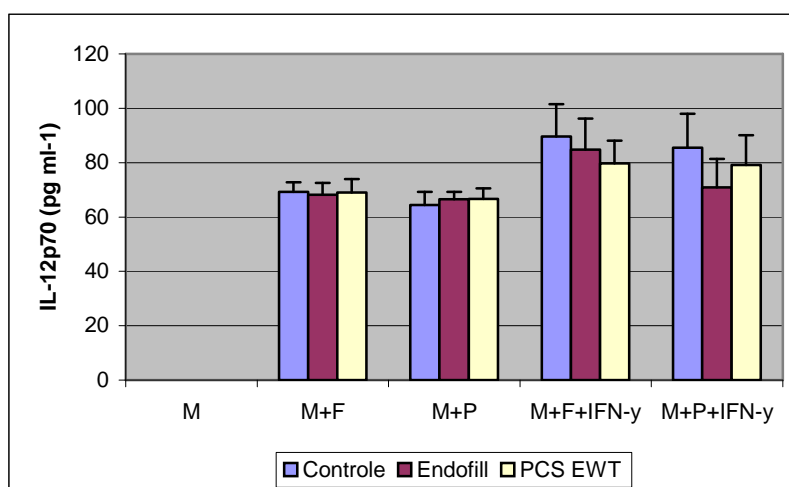


Gráfico 18- Produção de IL-12 por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6, após 24 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos obturadores endodônticos Endofill e PCS EWT



estimulados e não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T representa o desvio padrão. Sensibilidade: 29,7pg/ml.

### 5.8 Produção de Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina do tipo Th2 que interfere negativamente com a síntese de mediadores pró-inflamatórios, limitando a ação de funções de células Th1 (Awasti *et al.*, 2004), minimizando respostas imunes e conseqüentemente patologias inflamatórias (O'Garra *et al.*, 2004).

A produção desta citocina foi avaliada em culturas de macrófagos M1 e M2 estimuladas e não com o *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I), na presença e ausência dos cimentos endodônticos Endofill e PCS EWT. Os resultados estão expressos nos Gráficos 20 e 21. A produção de IL-10 não foi detectada em cultura de macrófagos M1 e M2 na ausência de estímulo bacteriano. Nenhum dos cimentos obturadores endodônticos interferiram com a produção desta citocina pelos macrófagos M1 estimulados com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), na presença e ausência de IFN- $\gamma$  (I). Por outro lado, a pré-incubação com PCS EWT® interferiu com a produção desta citocina pelos macrófagos M2 somente quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius*. Demonstrou-se ainda, que, comparando os grupos não tratados com cimento (grupos controle), os macrófagos M2, quando estimulados com *F. nucleatum*, apresentaram um índice estatisticamente significativo maior de produção desta citocina, que o grupo de macrófagos M1 ( $p < 0,05$ ).

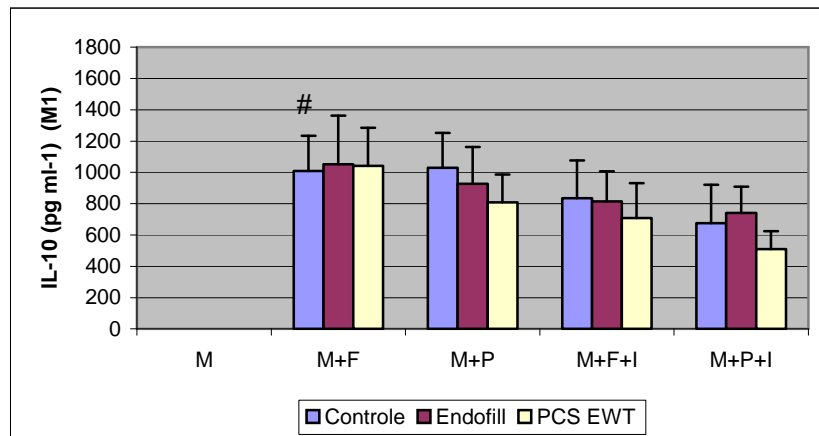


Gráfico 19- Produção de IL-10 por macrófagos M1 provenientes de camundongos C57BL/6, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos obturadores endodônticos Endofill e PCS EWT estimulados ou não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Teste *t* de Student). Sensibilidade: 25,9pg/ml.

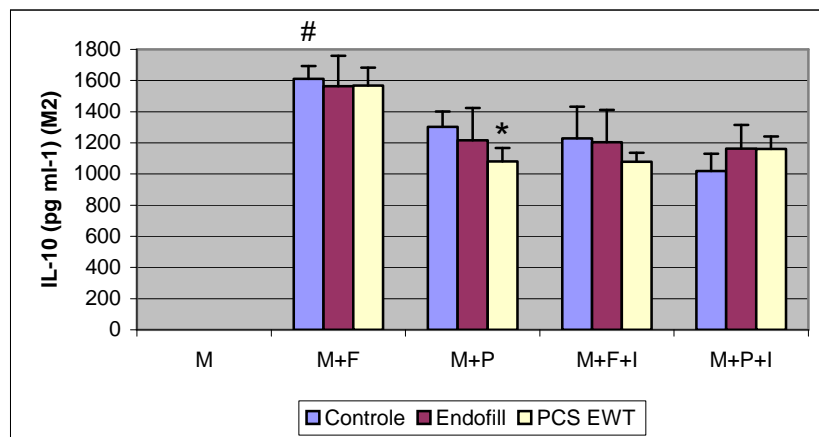


Gráfico 20- Produção de IL-10 por macrófagos M2 provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12/23p40<sup>-/-</sup>, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos obturadores endodônticos Endofill e PCS EWT estimulados ou não com *F. nucleatum* (F), *P. anaerobius* (P), com e sem IFN- $\gamma$  (I). O resultado representa a média de três experimentos realizados em triplicata. T indica o desvio padrão e \* indica diferença estatística das culturas pré-incubadas com os cimentos em relação às culturas controle, sem cimento ( $p < 0,05$ ) (Teste *t* de Student). # indica a diferença estatística entre as culturas de macrófagos M1 e M2, nas mesmas condições (Teste *t* de Student). Sensibilidade: 25,9pg/ml.

## 6 DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende de um diagnóstico e plano de tratamento acurados, conhecimento da anatomia e morfologia dentária, além dos conceitos tradicionais de limpeza e formatação adequadas e obturação tridimensional do SCR (Schilder, 1974; Johnson & Gutman, 2007). A obturação do SCR é o estágio final do tratamento endodôntico, a qual previne infiltração coronária e contaminação bacteriana, sela o ápice aos fluidos dos tecidos periapicais, além de selar os irritantes remanescentes no interior dos canais (Delivanis *et al.*, 1983). Durante a obturação dos SCR, os cimentos endodônticos são utilizados em conjunção com um material obturador sólido ou semi-sólido (Endodontists, 2004; Johnson & Gutman, 2007), permanecendo em contato íntimo com os tecidos perirradiculares (Pulgar *et al.*, 2002; Bernard & Szabo, 2003).

No decorrer dos anos, vários pesquisadores vêm avaliando a citotoxicidade dos cimentos obturadores endodônticos, utilizando-se diferentes metodologias (Hume, 1984; Bratel *et al.*, 1998; Makesi *et al.*, 1996; de Oliveira Mendes *et al.*, 2003).

Neste trabalho, utilizando-se duas marcas comerciais de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE), avaliou-se a sua capacidade de atuação nas respostas de macrófagos (M1 e M2) peritoneais murinos, dentre elas: viabilidade celular, aderência ao vidro, fagocitose de *S. boulardii*, produção de ROIs e NO, como também a produção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10.

Inicialmente verificamos a viabilidade celular de macrófagos M1 e M2, na presença e ausência dos cimentos endodônticos, que foram expostos às culturas celulares de maneira uniforme e estável, conforme metodologia previamente desenvolvida por nós (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003). Os cimentos foram manipulados e inseridos nas extremidades de capilares estéreis previamente cortados e colocados em contato com as suspensões celulares de macrófagos. Capilares vazios foram utilizados como controle. A viabilidade celular foi determinada em placas de 24 poços e em tubos de polipropileno, utilizando-se a técnica de exclusão do azul de tripan. Esta técnica se baseia na expulsão deste corante por células viáveis através da bomba de sódio e potássio, o que leva as células mortas a se tornarem impregnadas pelo corante, apresentando-se com a coloração azul. Incubaram-se, em placas de 24 poços,  $1 \times 10^5$  células/mL por 2, 24 e 72 horas, nas mesmas condições utilizadas nos demais experimentos (fagocitose, produção de NO e das citocinas TNF, IL-12 e IL-10). Nos tubos de polipropileno, incubaram-se  $1 \times 10^6$  células/ml por 2 e 24 horas, nas mesmas condições

utilizadas nos experimentos de aderência e produção de ROIs. Como os resultados foram similares para ambos os macrófagos, M1 e M2, na presença dos cimentos PCS EWT e Endofill, qualquer resultado obtido nos demais testes realizados, não podem, portanto, ser atribuído a uma maior ou menor viabilidade celular em decorrência do estímulo promovido pelo cimento. Utilizando-se macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c incubados nas mesmas condições deste estudo e com os mesmos cimentos, de Oliveira Mendes *et al.* (2003) demonstraram a mesma premissa. Entretanto, Melegari *et al.* (2006), utilizando a técnica de exclusão do azul de tripan relataram que o cimento Roth 801, a base de ZOE, causou morte celular significativa em culturas de fibroblastos e macrófagos. Algum componente deste cimento pode ter interferido com a viabilidade destas células.

Ao se analisar a aderência dos macrófagos, M1 e M2, na presença dos dois cimentos endodônticos, PCS EWT e Endofill, observou-se que os mesmos interferiram negativamente na aderência de ambos os macrófagos ao vidro. Como a aderência é o primeiro passo para o processo fagocítico e para a apresentação de antígenos pelos macrófagos inflamatórios (Unanue & Allen, 1987), a interferência neste processo, observada aqui, demonstra uma capacidade dos cimentos endodônticos avaliados de modificar a resposta imune, nos sítios perirradiculares. Nossos resultados assemelham-se àqueles obtidos por Sadeghein *et al.* (2001) e Oliveira Mendes *et al.* (2003), utilizando-se macrófagos peritoneais recuperados de camundongos BALB/c, onde observaram-se que os cimentos a base de ZOE prejudicam a aderência celular. Muitos outros materiais utilizados no transcurso da terapia endodôntica também interferem, *in vitro*, com a aderência de macrófagos. Dentre estes materiais citam-se o EDTA (Segura *et al.*, 1996), hidróxido de cálcio (Segura *et al.*, 1997), hipoclorito de sódio a 5,25% e glutaraldeído a 1% (Jímenez-Rúbio *et al.*, 1997), paramonoclorofenol e paramonoclorofenol canforado (Lhamas *et al.*, 1997), perborato de sódio (Jímenez-Rúbio & Segura, 1998), eugenol (Segura & Jímenez-Rúbio, 1998), e Tifell (formocresol-eugenol) (Segura *et al.*, 1998). Em conjunto, estes resultados remetem para a importância de um desbridamento efetivo dos SCR infectados, bem como a cuidadosa observância pelo clínico, do momento exato de se proceder à obturação dos SCR, uma vez que, como demonstrado neste estudo, o cimento obturador que permanecerá em íntimo contato com os tecidos periodontais adjacentes, interfere negativamente com a resposta do hospedeiro.

Os macrófagos desempenham papel crítico na imunidade inata, fagocitando partículas estranhas e produzindo citocinas. Atuam também como importantes células acessórias e efetoras na imunidade adquirida, apresentando antígenos aos linfócitos T (Metgzer, 2000; Fujiwara & Kobayashi, 2005). Devido à importância do processo fagocítico, tanto na resposta

imune inata quanto na adaptativa, este estudo procurou avaliar a interferência dos dois cimentos endodônticos selecionados nos processos de aderência e fagocitose. Utilizando-se os macrófagos M1 e M2, analisou-se sua capacidade de fagocitar a levedura *Saccharomyces boulardii*, que, devido ao seu grande tamanho, favorece sua contagem durante os procedimentos laboratoriais. Como os cimentos não interferiram na adesão das leveduras à superfície de ambos os macrófagos, acredita-se que os mesmos não alteram os seus receptores de adesão. Sabe-se que os receptores para a levedura não são os mesmos que medeiam a adesão de superfícies plásticas. De acordo com Person (1996), glicanas presentes na superfície de fungos parecem se ligar aos receptores “garis” na superfície de macrófagos.

Por sua vez, ao se analisar a fagocitose, observou-se que o processo sofreu interferência negativa dos cimentos em ambos os tipos celulares. O cimento Endofill, contudo, não interferiu na fagocitose do *S. boulardii* pelos macrófagos M1. Atualmente, sabe-se que os macrófagos recuperados de camundongos BALB/c, apresentam um perfil M2 (Mills *et al.*, 2000), similar àquele de macrófagos M2 recuperados de camundongos C57BL6/IL-12/23p40<sup>-/-</sup> (utilizados neste estudo) (Mills *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2002). Resultados similares aos encontrados aqui foram demonstrados por de Oliveira Mendes *et al.* (2003), em macrófagos de camundongos BALB/c, com prejuízo do processo fagocítico celular, após incubação com os cimentos PCS EWT e Endofill, tanto a fresco quanto após sua presa e por Makesi *et al.* (1996) que demonstraram que o processo fagocítico realizado por macrófagos peritoneais de ratos foi prejudicado na presença de alguns materiais obturadores endodônticos, dentre eles, dois cimentos a base de ZOE (Canals-N e Canals). De forma interessante, observaram-se, neste estudo, que ao contar-se o número de leveduras fagocitadas, havia um maior número de *S. boulardii* no citoplasma dos macrófagos M2 quando comparados àqueles M1. Resultados semelhantes haviam sido relatados por Bastos *et al.* (2002) e Rezende *et al.* (2007). Este resultado, contudo, não se deve a uma interferência dos cimentos endodônticos na adesão das leveduras à superfície dos macrófagos M1 e M2, conforme demonstrado nos testes de adesão. É preciso lembrar que a fagocitose é um processo complexo que requer a ligação de receptores celulares com ligantes da superfície da partícula, uma rede de transdução de sinais, o rearranjo do citoesqueleto celular e uma série dinâmica de eventos de fusão, fissão e remodelamento da membrana do fagócito (Swanson & Baer, 1995; Allen & Aderem, 1996; Desjardins, 2003), podendo ocorrer de forma distinta nos dois tipos celulares, M1 ou M2. Este resultado pode se dever, também, a uma maior habilidade dos macrófagos M1 em eliminar a levedura que fora internalizada o que levaria a

um menor número durante a contagem nestas células, apesar de não termos encontrado dados na literatura que corroboram com este fato.

Após o engolfamento, a célula fagocítica submete o antígeno a componentes tóxicos e enzimas, procurando eliminá-lo (Karolin & Segal, 1996). Os dois mecanismos antimicrobianos de macrófagos ativados, mais bem identificados e geneticamente confirmados, são os radicais intermediários de oxigênio (ROIs) e nitrogênio (NO) (Shiloh *et al.*, 1999). Neste estudo investigaram-se se os cimentos endodônticos interfeririam na produção de ROIs e NO por macrófagos M1 e M2. Observou-se que ambos os cimentos interferiram negativamente com a produção basal e estimulada de ROIs nos macrófagos M1, o que foi também observado, de maneira significativa, nos macrófagos M2 estimulados pelo cimento PCS EWT. A produção de ROIs é dependente do sistema NADPH fagócito oxidase que é composto por subunidades proteicas localizadas na membrana plasmática e no citoplasma dos macrófagos em repouso. A ativação da NADPH oxidase requer interações de suas subunidades proteicas na membrana do fagossoma dos macrófagos ativados. Os resultados aqui observados, sugerem que os cimentos endodônticos avaliados podem interferir negativamente com estas interações protéicas e, conseqüentemente, nos processos de eliminação microbiana. Ao se comparar a produção de ROIs entre os macrófagos M1 e M2, observou-se que os primeiros produziram níveis significativamente maiores, tanto em relação a produção basal quanto em relação a estimulada pelo zymosan. Esta maior produção observada nos macrófagos M1 está de acordo com os resultados relatados por Mosser (2003) e Rezende *et al.* (2007).

Selecionando dois microrganismos sabidamente envolvidos nas infecções de origem endodôntica, o *Fusobacterium nucleatum* e o *Peptostreptococcus. anaerobius* (Sundqvist, 1992; Lanna *et al.*, 2001), na presença e ausência de IFN- $\gamma$ , este trabalho procurou avaliar o papel dos cimentos Endofill e PCS EWT na produção de NO, estimulando, *in vitro*, macrófagos peritoniais murinos M1 e M2. Observou-se que os cimentos não interferiram com a produção de NO por macrófagos M1. Por outro lado, a produção de NO pelos macrófagos M2 foi inibida quando ativada com *F. nucleatum*, na presença e ausência de IFN- $\gamma$ . Se houver uma interferência por parte dos cimentos, inibindo a síntese de proteínas, a produção de NO pode estar sendo diminuída porque é dependente de iNOS. Os macrófagos M1, quando estimulados com *F. nucleatum* na presença de IFN- $\gamma$ , apresentaram um índice maior (estatisticamente significativo) de produção de NO que o grupo de macrófagos M2, na ausência dos cimentos obturadores. Este resultado, corroborado por vários outros na literatura

(Bogdan *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003; Kato *et al.*, 2003), demonstra que células com perfil pro-inflamatório (tipo 1) são mais facilmente ativadas para produzir NO. Por sua vez, as células do tipo 2 que secretam principalmente as citocinas TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4, as quais, inibindo a iNOS e estimulando a arginase, respondem metabolicamente com baixos níveis de produção de NO (Mills *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003).

As citocinas desempenham papel importante na patogênese das lesões periapicais. Já foi demonstrado que a inflamação que aí ocorre não é somente fruto da ação direta de microrganismos, mas também de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas (Stashenko *et al.*, 1998). Neste estudo, avaliou-se se os cimentos obturadores das duas marcas comerciais interfeririam na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos M1 e M2. Procurando-se reproduzir experimentalmente o que ocorre *in vivo* nos tecidos adjacentes à infecção endodôntica, este estudo analisou a produção destas citocinas, nas condições acima pré-estabelecidas, mas também, na presença e ausência dos antígenos de *F. nucleatum* e *P. anaerobius*, acrescidos e não de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e adaptativa mediada por células (Schroder *et al.*, 2004).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que exerce funções cruciais na ativação e regulação das respostas inflamatórias e imunológicas. Os fagócitos mononucleares ativados são a fonte primordial desta citocina (Aggarwall, 2003; Xanthoulea *et al.*, 2004). De acordo com Stashenko *et al.* (1990), o TNF- $\alpha$ , nas lesões periapicais, tem um papel relevante na ativação osteoclástica. Neste estudo, observou-se que tanto os macrófagos M1 quanto M2 produziram TNF na ausência de estímulo bacteriano. Mosser *et al.* (2003) haviam demonstrado que os macrófagos M2 e M1, quando estimulados, diferenciam-se apenas na produção de IL-12 e IL-10, produzindo as demais citocinas de forma semelhante. Em resposta ao estímulo com MTA, Rezende *et al.* (2005) demonstraram, *in vitro*, que a produção de TNF por macrófagos M1 e M2, na ausência de qualquer estímulo, se deu de forma semelhante ao encontrado neste estudo. Com relação à produção de TNF após estímulo bacteriano ou acréscimo de IFN- $\gamma$ , na presença dos cimentos endodônticos, observamos algumas diferenças. PCS EWT interferiu negativamente com a produção desta citocina quando os macrófagos M1 foram estimulados por *F. nucleatum*. Ambos os cimentos prejudicaram a produção de TNF quando as culturas M1 foram estimuladas com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ . A produção desta citocina, estimulada com *F. nucleatum* e IFN- $\gamma$ , por macrófagos M2, foi

prejudicada na presença de ambos os cimentos. O Endofill interferiu negativamente com a produção desta citocina, por macrófagos M2, estimulada com *P. anaerobius*, na presença de IFN- $\gamma$ . Estes resultados sugerem que os cimentos podem interferir negativamente nas fases iniciais da resposta imune. Nossos resultados demonstraram ainda que, comparando-se os grupos não tratados com cimento (grupos controle), os macrófagos M1, quando estimulados com *P. anaerobius* na presença de IFN- $\gamma$ , apresentaram um índice estatisticamente significativo maior de produção desta citocina, que o grupo de macrófagos M2. Encontramos divergências na literatura no que diz respeito à produção de citocinas frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas. Hessle *et al.* (2000) demonstraram que bactérias gram-positivas são importantes indutoras de IL-12 e que as gram-negativas estimulam preferencialmente a produção de IL-10; Karlsson *et al.* (2002) verificaram que as bactérias gram-positivas induziram níveis mais altos de produção de IL-12 e TNF que as gram-negativas; Feezor *et al.* (2003) e Rezende *et al.* (2005) demonstraram o mesmo padrão de produção de citocinas frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estes resultados divergentes podem ser devido as diferentes espécies bacterianas testadas nestes estudos. Fica claro, por estes resultados, que a relação entre o tipo de citocina produzida por macrófagos e a similaridade entre a composição da parede celular de diferentes espécies bacterianas que a torna gram-positiva ou gram-negativa é duvidosa. Parece, pelos resultados relatados, que diferentes espécies interagem com macrófagos de formas diferentes, provocando respostas diversas.

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente pelas células apresentadoras de antígeno ativadas por microrganismos ou seus subprodutos, como também pelos linfócitos T. É uma potente moduladora das funções das células NK e T. Devido à sua atividade sobre estes dois tipos celulares, a IL-12 funciona como um elo entre as respostas imune inata e adaptativa (Gately *et al.*, 1998; Trinchieri, 2003). Sua detecção foi mensurada apenas nas culturas de macrófagos M1, uma vez que os macrófagos M2 são oriundos de animais p40 knockouts e, conseqüentemente, não expressam a IL-12p70. A produção de IL-12 não foi detectada nas culturas na ausência dos estímulos bacterianos. Observou-se que a produção desta citocina aumentou na presença dos estímulos bacterianos e mais ainda, quando acrescidos de IFN- $\gamma$ . Nossos resultados coincidem com os resultados encontrados por Ma *et al.* (1996); Hayes *et al.* (1998) e Rezende *et al.* (2005). Desta forma, torna-se claro que nenhum dos cimentos endodônticos avaliados interferiu com a produção da IL-12 pelos macrófagos M1, sugerindo que os mesmos não prejudicam as ações mediadas por esta citocina, durante as respostas às infecções periapicais. Anteriormente, resultado similar havia



sido relatado por de Oliveira Mendes *et al.* (2003), que observaram que os mesmos cimentos avaliados aqui, não interferiam com a produção da IL-12 por macrófagos peritoneais inflamatórios recuperados de camundongos BALB/c.

A IL-10 é uma citocina do tipo Th2 que interfere negativamente com a síntese de mediadores pró-inflamatórios, limitando assim a ação de funções de células Th1. (Awashi *et al.*, 2004; O'Garra *et al.*, 2004). Nas lesões periapicais, a IL-10 inibe a reação osteoclástica (Kawashima *et al.*, 1996; Stashenko *et al.*, 1998). Com o intuito de demonstrar se os cimentos endodônticos interferiram na produção de IL-10 por macrófagos M1 e M2, esta foi avaliada após o estímulo das células, na presença e ausência dos cimentos. Observou-se que a IL-10 não foi detectada nas culturas M1 e M2 na ausência de estímulo bacteriano. Nenhum dos cimentos obturadores endodônticos interferiu com a produção desta citocina pelos macrófagos M1 na presença dos estímulos testados. Por outro lado, a pré-incubação com PCS EWT interferiu com a produção desta citocina pelos macrófagos M2 somente quando as culturas foram estimuladas com *P. anaerobius*. Demonstrou-se ainda, que, comparando os grupos não tratados com cimento (grupos controle), os macrófagos M2, quando estimulados com *F. nucleatum*, produziram mais IL-10 que o grupo de macrófagos M1. Este resultado coincide com os trabalhos de Rezende *et al.* (2005).

Demonstramos, mais uma vez, que os cimentos endodônticos PCS EWT e Endofill interferiram negativamente com importantes atividades de macrófagos. Por esta razão, sugerimos que a extrusão dos cimentos aos tecidos periradiculares deve ser evitada.

## 7 CONCLUSÕES

Pôde observar-se que:

- Os cimentos PCS EWT e Endofill não interferiram na viabilidade celular de macrófagos M1 e M2.
- Os cimentos PCS EWT e Endofill inibiram a aderência de macrófagos M1 e M2 ao substrato; a fagocitose de *S. boulardii* por macrófagos M2; a produção basal e estimulada de ROIs por macrófagos M1; a produção de NO estimulados com *F. nucleatum* + *IFN- $\gamma$*  por macrófagos M2; a produção de TNF estimulada por *P. anaerobius* + *IFN- $\gamma$*  por macrófagos M1 e a produção de TNF estimulada com *F. nucleatum* + *IFN- $\gamma$*  por macrófagos M2;
- PCS EWT interferiu negativamente com a fagocitose de *S. boulardii* por macrófagos M1; com a produção basal de ROIs por macrófagos M2; com a produção de TNF estimulada com *F. nucleatum* por macrófagos M1 e com a produção de IL-10, estimulada com *P. anaerobius*, por macrófagos M2.
- O Endofill inibiu a produção de TNF, estimulada por *P. anaerobius* + *IFN- $\gamma$* , por macrófagos M2.

Assim, concluiu-se que os cimentos endodônticos Endofill e PCS EWT interferem negativamente com importantes respostas efetoras dos macrófagos e que a extrusão dos mesmos para os tecidos periradiculares no momento da obturação do SCR deve ser evitada. Podemos especular que em presença de infecção ou em caso de existir a possibilidade da persistência do microrganismo na região, a obturação do SCR não deverá ser realizada, pelo menos neste momento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN. *Imunologia Celular e Molecular*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 580p., 2005.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews*. 3:745-56, 2003.

AESAERT, G. Iatrogenic risks during the obturation of the root canal system. *Rev Belge Med Dent*. 55(2):104-23, 2000.

AL-AWADHI, S., SPEARS, R., GUTMANN, J.L., OPPERMAN, L.A. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod*. 30(7):527-33, 2004.

ALBER, G., AL-ROBAIY, S., KLEINSCHEK, M., KNAUER, J., KRUMBHOLZ, P., RICHER, J., SCHOENEBERGER, S., SCHUETZE, N., SCHULZ, S., TOEFER, K., VOIGLAENDER, R., LEHMANN, J., MUELLER, U. Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. *J Allergy Clin Immunol*. 117(2 Suppl Mini-Primer):S441-5, 2006.

al-KHATIB, Z.Z.; Baum, R.H.; MORSE, D.R.; Yesilsoy, C.; BHAMBHANI, S.; FURST, M.L. The antimicrobial affect of various endodontic sealers. *Oral Surg Oral med Oral Pathol*. 70: 784, 1990.

ALLAN, N.; WALTON, R.; SHAFFER, M. Setting time for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. *J Endodon*. 27:421, 2001.

ALLEN, L, H., ADEREN, A. Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology*. 8: 36-40, 1996.

AMBROSE, C.T. The Osler slide, a demonstration of phagocytosis from 1876 Reports of phagocytosis before Metchnikoff's 1880 paper. *Cell Immunol*. 240(1):1-4, 2006.

ARAKI, K., SUDA, H., BARBOSA, S. V., SPANGBERG, L. S. W. Reduced toxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J. End*. 19:554-557, 1993.

AUGSBURGER, R. A., PETERS, D. D. Radiographic evaluation of extruded obturation materials. *J. Endod*. 16: 492-497, 1990.

AWASHI, A.; MATHUR R.K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res*. 119(6):238-58, 2004.

AZAR, N.G., HEIDARI, M., BAHRAMI, Z.S., SHOKRI, F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J. Endod*. 26(8):462-5, 2000.

BACKHORDAR, R.A., RUI, T., WARANABE, L. An avaluationof sealing ability of calcium hydroxide sealers. *O surg O Med O Pathol*. 68: 88-92, 1989.

BARBIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. The production by leukocytes of superoxide, a potencial bactericidal agent. *J Clin Invest.* 52:741, 1973.

BARBOSA, S. V., ARAKI, K., SPANGBERG, L. S. W. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 75: 357- 361, 1993.

BARKER, B. C. W., LOCKETT, B. C., PARSON, K. C. The demonstration of root canal anatomy. *Australian Dent. Journal.* 14(2): 37-41, 1969.

BARRET, M.T. The internal anatomy of the teeth with special reference to the pulp with its branches. *D Cosmos.* 67(6): 581-92, 1925.

BASTOS, K.B.; ÁLVAREZ, J.M.; MARINHO, C.R.F.; RIZZO, L.V.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *Journal of Leukocyte Biology.* 71:271-278, 2002.

BASTOS, K.B.; MARINHO, C.R.F.; BARBOZA, R.; RUSSO, M.; ÁLVAREZ, J.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R. What kind of massage does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes and Infection.* 6:630-36, 2004.

BENATTI, O.; STOLF, W.L.; RUHNKE, L.A.; Verification of the consistency, setting time, and dimensional changes of root canal filling materials. *O Surg O Med O Pathol.* 46:107-13, 1978.

BERNATH, M., SZABO, J. Tissue reaction initiated by different sealer. *Int Endod J.* 36(4):256-61, 2003.

BILGNER, S., ESENER, T., SÖYLEMEZOGLU, F., TIFTIK, A. M. The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers. *J. Endod.* 23: 105-109, 1997.

BJORNDAL, L., CARLSEN, O., THUESEN, G., DARVANN, T., KREIBORG, S. External and internal macromorphology in 3D-reconstructed maxillary molars using computerized X-ray microtomography. *Int Endod J.* 32(1): 3-9, 1999.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 11(2):66-75, 2001.

BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal Exp. Medicine.* 174:1549-55, 1991.

BOMBANA, A.C. Estudo histométrico da reação do tecido subcutâneo de ratos ao implante de tubos de polietileno, contendo cimento de Rickert acrescido de diferentes concentrações de delta-hidro cortisona. *Rev Ass Paul Circ Dent.* 34- 40, 1980.

- BONECCHI, R. et al. Divergent effects of IL-4 and interferon- $\gamma$  on macrophage derived chemokine (MDC) production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood*. 92:2668-71, 1998.
- BOUILLAGUET, S. WATAHA, J.C., LOCKWOOD, P.E., GALGANO, C., GOLAY, A., KREJCI, I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*. 112(2):182-7, 2004.
- BRATEL, J., JONTELL, M., DAHLGREN, U., BERGENHOLTZ, G. Effects of root canal sealers on immunocompetent cells *in vitro* and *in vivo*. *Int Endod J*.31:178- 188, 1998.
- BRISEÑO, B. M., WILLERHAUSEN, B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. I. Zinc oxide -eugenol- based sealers. *J Endod*. 16: 383-386, 1990.
- BRKANIC, T.; ZIVKOVIC, S.; DROBAC, M. Root canal preparation techniques using nickel-titanium rotary instruments. *Med Pregl*, 58(3-4):203-7, 2005.
- BRONTE, V., ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews*. 5: 641-54, 2003.
- BROWN, E.J.; GRESHAN, H.D. Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- CARLOS, I.Z., et al. Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: FERREIRA, C.L.L. *Prebióticos e probióticos : atualização e prospecção*. 1ª ed. Viçosa. Cap.7, p.135-54, 2003.
- CELADA A.; NATHAN, C. Macrophage activation revisited. *Immunol.Today* 15, 100-102, 1994.
- COOPER, A.M., et al. Interleukin-12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mucobacterium tuberculosis. *J Exp.Med*. 186:39-45, 1997.
- CRANE, D.L., HEUER, M. A., KAMINSK, E. J., MOSER, J. B. Biological and physical properties of na experimental root canal sealer without eugenol. *J End*. 6:438-445, 1980.
- CUNHA, F. Q., MONCADA, S. and LIEW, F. Y. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide syntase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 182: 1155-1159, 1992.
- D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N.M., MA, X., KUBIN, M. Trinchieri, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/ IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med*. 178:1041–1048, 1993.
- D'ANDREA, A., RENGARAJU, M., VALIANTE, N. M., CHEHIMI, J., KUBIN, M., ASTE-AMEZAGA, M., CHAN, S. H., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., NICKBARG, E.,

CHIZZONITE, R., WOLF, S. F., TRINCHIERI, G. Production of natural killer stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176: 1387-1398, 1992.

DAVIS, M.C.; WALTON, R.E.; RIVERA, E.M. Sealer distribution in coronal dentin. *J Endod.* 28(6):464-6, 2002.

DE DEUS, Q.D. *Topografia da cavidade pulpar* - contribuição ao seu estudo. Doctorate thesis, Belo Horizonte, 1960.

DE DEUS, Q. D. de. *Endodontia.*, 5.ed. Rio de janeiro: Medsi. 695p.,1992.

DELIVANIS, P.D., MATTISON, G.D., MENDEL, R.W. The survivability of F43 strain of *Streptococcus sanguis* in root canals filled with gutta-percha and Procosol cement. *J Endod.* 9:407, 1983.

DESJARDINS, M. Er-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature.* 3:280-91, 2003.

DING, A H., NATHAN, C.F., GRAYCAR, J., DERYNCK, R., STUEHR, D. J. and SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $-\beta$ 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- $\gamma$ . *J.Immunol.* 145: 940-944, 1990.

DING, A. H., NATHAN, C. F. and STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activated cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412, 1988.

DRAPPIER, J. C., WIETZERBIN, J. and HIBBS, J. B. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18: 1587-1592, 1988.

EDWARDS, J.P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A.; MOSSER, D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 80(6):1298-307, 2006.

ENDODONTICS AAO: *Guide to Clinical Endodontics*, 4 ed, Chicago. American Association of Endodontists, 2004.

ERAUSQUIN, J., MURUZABAL, M. Root canal fillings with zinc oxide-eugenol cement in the rat molar. *Oral Surg.* 24: 547-558, 1967.

ESPEY, M.G., MIRANDA, K.M., THOMAS, D.D., XAVIER, S., CITRIN, D., VITEK, M.P., WINK, D.A. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species. *Ann N.Y. Acad Sci.* 962:195-206, 2002.

ESTRELA, C. *Ciência Endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas. p.1009, 2004.

- FEEZOR, R. *et al.* Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infection and Immunity*. 71(10): 5803-13, 2003.
- FEIGLIN, B. Effect of some endodontic sealers on cell migration in experimental granulomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 63: 371-374, 1987.
- FIDEL, R.A.S. *Estudo da anatomia interna de molares superiores, submetidos ao processo e injeção da resina à base de poliéster.* Tese de mestrado. Fac de Odont UERJ. 31p, 1988.
- FIORENTINO D.F., SLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147: 3815-22, 1991a.
- FORMAN, H.J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 166:166p, 2002.
- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., KOHLHASS, K. L. and MURAD, F. Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: inhibition by transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Pharmacol.* 255: 161-165, 1992.
- FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. Macrophages and inflammation. *Curr Targets Inflamm Allergy.* 4(3):281-6, 2005.
- GARCIA, X., STEIN, F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis.* 17(2):55-7, 2006.
- GARG, A.K., AGGARWAL, B.B. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Molecular Immunology.* 39:509-17, 2002.
- GATELY, M.K., ANDERSON, T.D., HAYES, T.J. Role of asialo-GM1-positive lymphoid cells in mediating toxic effects of recombinant IL-12 in mice. *J Immunol.* 141:189-200, 1998.
- GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., JAMES, S. L. and SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. *J. Immunol.* 148:1792-1796, 1992.
- GERONIKAKI, A.A., GAVALAS, A.M. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput screen.* 9(6):425-42, 2006.
- GEROSA, R., MENEGAZZI, G., BORIN, M., CAVALLERI, G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J Endod.* 21: 446-448, 1995.
- GEURSTSEN, W., LEYHAUSEN, G. Biological aspects of root canal filling materials-histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Invest.* 1:5-11, 1997.
- GIAIMIS, J. *et al.* A new simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *Journal of Immunological Methods.* v.154, n.185-193, 1992.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3:23-35, 2003.

- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, I.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and <sup>15</sup>nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*126:131-137, 1982.
- GREENBERG, S., SILVERSTEIN, S. C. Phagocytosis. In. Paul W. E., *Fundamental Immunology.*, 3. Ed. N.Y.: Raven Press Ltda., p.941-964, 1993.
- GRIEVE, A. R., PARKHOLM, J. D. O. The sealing properties of root filling cements. Further studies. *British Dental Journal*, London.135 (8): 327-331, 1973.
- GRIFFIN, F. M. Jr., GRIFFIN, J. A., SILVERSTEIN, S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis II. The interaction of macrophages with anti immunoglobulin IgG-coated bone marrow derived lymphocytes. *J. Exp Med.* 144: 788-809, 1976.
- GROSSMAN, L.I. Algunas observaciones sobre obturación de conductos radiculares. *Rev. Asoc. Odontol. Argent.* 50(2):61-6, 1962.
- GROSSMAN, L.I. An improved root canal cement. *J. Am. Dent. Assoc.* 56(3):381-5, 1958.
- GROSSMAN, L.I. *Endodontic Practice*, 11th ed. Philadelphia, Lea & Febijer, p. 255, 1988.
- GUBLER, U.; CHUA, A.O.; SHOENHAUT, D.S.; DWYER,C.M.; McCOMAS, W.; MOTYKA R.; NABAKI, N.; WOLITZKY, A.G.; QUIMM, P.M. FAMILETTI, P.C. et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:4143-47, 1991.
- GUTMANN, J. L., WITTERSPOON, D. E., *Obturation of the cleaned and shaped root canal system.* In Cohen S., Burns R.C., *Pathways of the pulp.* 7ed. St. Louis: CV Mosby Co., p.258-361, 1998.
- HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. In: *The macrophage* (Bourke, B. and Lewis, C. eds), pp.73-102, Oxford University Press, Oxford, 2002.
- HAYES, M.P., MURPHY, F.J., BURD, P.R. Interferon- $\gamma$ -dependent inducible expression of the human interleukin-12-p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Blood.* 91:4645-51, 1998.
- HESSLE, C. ANDERSON, B., WOLD, A.E. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic Interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infection and immunity.* 68(6): 3581-86, 2000.
- HOLLAND, R. A histological comparison of periapical inflammatory and neural responses to two endodontics sealers in the ferret. *Arch Oral Biol.*, 39:539-544, 1994.



- HUANG, F.M., TAI, K.W., CHOU, M.Y., CHANG, Y.C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 35(2):153-8, 2002.
- HUANG, F.M., 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.* 31(9):679-83, 2005.
- HUME, W. R. Na analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *J Dent Res.* 63:881-884, 1984.
- JANEWAY, C.A., et al. *Imunobiologia.* 5ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 767p., 2002.
- JIMÉNEZ-RUBIO, A., SEGURA, J. J., LLAMAS, R., JIMÉNEZ-PLANAS, A., GUERRERO, J. M., CALVO, J. R. *In vitro* study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod.* 23:562-564, 1997.
- JIMÉNEZ-RUBIO, A., SEGURA, J. J. The effect of the bleaching agent sodium perborate on macrophage adhesion *in vitro*: implications in external cervical root resorption. *J Endod.* 24:229-232, 1998.
- JOHNSON, W.T., GUTMAN, J.L. Obturação do Sistema de Canais Radiculares. Em: COHEN, S., HARGREAVES, K.M. *Caminhos da polpa.* 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1079p., 2007.
- JONES, D.E.; ELLOSO, M.M.; SCOTT, P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Bioscience,* 3:1171-80, 1998.
- JONTEL, M.; OKIJI, T.; DAHGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9(2): 179-200, 1998.
- JUN, C-D.; Lee, J-Y.; LEE, B-S.; CHOI, B-M.; UM, J-Y.; KWAK, H-J.; JI, K-Y.; KIM, H-M; CHUNG, H-T. Generation of nitric oxide inhibits formation of superoxide in macrophages during activation. *Biochemistry and Molecular Biology Internacional.* 34(1): 1- 8, 1994.
- KAPLAN, A.E., ORMAECHEA, M.F., PICCA, M., CANZOBRE, M.C., UBIOS, A.M. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 36(8):527-32, 2003.
- KARLSSON, H., HESSLE, C.R. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infection and Immunity.* 70(12): 6688-96, 2002.
- KAROLIN, P.S., SEGAL, A.W. NADPH Oxidase. *Int J Biochem Cell Biol.* 28: 1191-95, 1996.
- KATO, C., MIKAMI, M., SUZUKI, A., SAITO, K. The reduction of Fusobacterium nucleatum in mice is irrelevant to the nitric oxide induced by iNOS. *Microbiol Immunol.* 47(1): 27-35, 2003.

- KAYAOGU, G.; ERTEN, H.; ALAÇAM, T.; ORSTRAVIK, D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 38(7):483-8, 2005.
- KAWASHIMA, N., KOSAKA, T., SUDA, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod.* 22:311-326, 1996.
- KAZEMI, R. SAFAVI, K. SPANGBERG, L. Dimensional changes of endodontic sealers. *Oral Surg.* 76:766, 1993.
- KEY, J.E.; RAHEMTULLA, F.G.; ELEAZER, P.D. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 32(8):756-8, 2006.
- KIM, J.S., BAET, S.H., BAE, K.S. In vivo study on the biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *J Endod.* 30(10):708-11, 2004.
- KOCH, F., STANZL, U., JENNEWEIN, P., JANKE, K., HEUFLAR, C., KAMPGEN, E., ROMANI, N., SCHULAE, G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med.* 184: 741-46, 1996.
- KOLOKOURIS, I., ECONOMIDES, N., BELTES, P., VIEMMAS, I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J. Endod.* 24: 82-85, 1998.
- LANGELAND, K. LIAO, K. PASCON, E. A. Work-saving devices in endodontics: efficacy of sonic and ultrasonic techniques. *J. Endod.* 11:499-510, 1985.
- LANGELAND, K. Root canal sealants and pastes. *Dent Clin North Am.* 18: 309, 1974.
- LANNA, M.A. *et al.* Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol and Immunol.* 16:100-105, 2001.
- LEE, A., WHITE, M. K. B., HASLETT, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology.* 54:283-288, 1993.
- LEONARD, W.J. Type I Cytokines and Interferons and Their Receptors. In: *Fundamental Immunology.* 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- LI, P., SUN, M., WOHLAND, T., HO, B., DING, J.L. The molecular mechanism of interaction between sushi peptide and *Pseudomonas* endotoxin. *Cell Mol Immunol.* 3(1):21-8, 2006.
- LIN, L. M., SKIRIBNER, J. E., GAENGLER, P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J. Endod.* 18: 625-627, 1992.

- LLAMAS, R., SEGURA, J. J., JIMÉNEZ-RUBIO, A., JIMÉNEZ-PLANAS, A. *In vitro* effect of paramonochlorophenol and camphorated paramonochlorophenol on macrophages. *J Endod.* 23:728-730, 1997.
- LOCKSLEY, R. M. KILLEEN, N., LEONARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies. Integrating mammalian biology. *Cell.* 104(4): 487-501, 2001.
- LOVDAHL, P.E. Endodontic retreatment. *Dent Clin North Am.*36:473-90, 1992.
- MA, X.; CHOW, J.M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S.F.; DZIALO, R.; TRINCHIERI, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 183(1):147-57, 1996.
- MAcCOMB, D., SMITH, D. C., BEAGRIE, G. S. The results of “in vivo” endodontic chemomechanical instrumentation – a scanning electron microscopic study. *Journal of British Endodontic Society.* 9 (1): 11-18, 1976.
- MAcMICKING, J., XIE, Q., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350, 1997.
- MAK, T.H.; PENNINGER, J.M.; OHASHI, P.S. Knockout mice:a paradigm shift in modern immunology. *Nature Reviews.* 1:11-9, 2001.
- McMULLIN, B.B.; CHITTOCK, D.R.; ROSCOE, D.L. ; et al. The antimicrobial effect of nitric oxide on the bacteria that cause nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients in the intense care unit. *Resp Care.* 50:1451-56, 2005.
- MAKESI, T., NAKATA, K., KOHSAKA, T., KOBAYASHI, F., HIRANO, S., NAKAMURA, H. Lack of correlation between the amount of eugenol released from zinc oxide-eugenol sealer and cytotoxicity of the sealer. *J. Endod.* 17: 76-79, 1991.
- MAKESI, T., YASUMURA, K., NAMBA I., KOBAYASHI, F., NAKAMURA, H. Alterations in macrophages after exposure to root canal filling materials. *J. Endod.* 22: 450-454, 1996.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology.* 23(11):549-55, 2002.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology.* 25(12):677-86, 2004.
- MARKOVITZ, K., MOYNIHAN, M., LIU, M., KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 73: 729-737, 1992.

- MATTHEWS, D. J., CALLARD, R. E. Interleukin-13. Em: MIRE-SLUIS, A. R., THORPE, R. *Cytokines*. 1ed. San Diego: Academic Press Inc., 205-215, 1998.
- MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DIPADOVA, K.; BEHIN, R.; GATELY, M.K.; LOUIS, J.A.; ALBERT, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol*. 26:1553-59, 1996.
- MELEGARI, K.K., BOTERO, T.M., HOLLAND, G.R. Prostaglandin E production and viability of cells cultured in contact with fresh mixed endodontic materials. *Int Endod J*. 39(5):357-62, 2006.
- METCHINIKOFF, E. *Immunity in infective diseases* (translated from French by FG Binnie). Cambridge: Cambridge University Press, 1905.
- METZER, D., BUCHANAN, J.M., COLLINS, J.T., LESTER, T.L., MURRAY, K.S., VAN CLEAVE, V.H., VOGEL, L.A., DUNNICK, W.A. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 795: 100-115, 1996.
- METZER, Z. Macrophages in periapical lesions. *Endodon Dent Traumatol*. 16:1-8, 2000.
- MICKEL, A.K.; NGUYEN, T.H. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endodon*. 29: 257, 2003.
- MIGLIAU, G., TURCO, S., GUIDA, A., GALLOTTINI, L. Treatment of curved canals: from stainless steel to nickel titanium. *Minerva Stomatol*. 53(6):325-35, 2004.
- MILLS, C. D. et al. Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*. 164:6166-6173, 2000.
- MITTAL, M. CHANDRA, S., CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod*. 21(12): 622-4, 1995.
- MOORE, K.W., de WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O'GARRA, L. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol*. 19:683, 2001.
- MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; de WALL MALEFYT, R.; VIEIRA, P. MOSMANN, T.R. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 11:165-90, 1993.
- MOSMANN, T.R. Properties and functions of interleukin-10. *Adv. Immunol*. 56:1, 1994.
- MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 73:209-212, 2003.
- MULLER, W.A.; STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. The membrane proteins of the vascular system. II. Birectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J Cell Biol*. 86:304-313, 1980.
- NANCE, R.; TYNDALL, D.; LEVIN, L.G.; TROPE, M. Identification of root canals in molar by tuned-aperture computed tomography. *Int Endod J*. 33(4):392-6, 2000.

NATHAN, C., SHILOH, M. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Colloquium*. 97(16):8841-8848, 2000.

NAUSSEF, W.M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol*. 122(4); 277-91. Epub, 2004.

NEKOOOFAR, M.H., GHANDI, M.M., HAYES, S.J., DUMMER, P.M. The fundamental operating principles of electronic root canal length measurement devices. *Int Endod J*. 39(8):595-609, 2006.

NGUYEN, Nguyen, T. Obturation of root canal system. In: COHEN, S., BURNS, R.C. *Pathways of the pulp*. 6.ed. Mosby: Year Book, 1994. Cap.9, p.219-271, 1997.

O'GARRA, A. Citokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8:275-83, 1998.

O'GARRA, A., VIEIRA, P.L., VIEIRA, P., GOLDFELD, A.E. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*. 114(10):1372-8, 2004.

OLIVEIRA MENDES, S.T. et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod*. 29(2): 95-99, 2003.

ORSTAVIK, D., MJÖR, I. A. Histopathologic and X-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *J Endod*. 14: 13-23, 1988.

ORSTAVIK, D., MJÖR, I. A. Usage test of four endodontic sealers in *Macaca fascicularis* monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 73: 337-344, 1992.

ORSTAVIK, D. Physical properties of root canal sealers: measurements of flow, working time, and compressive strength. *Int Endod J*. 16:99, 1983.

PALMER, R. M., ASHON, D. S., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. (London) 333: 664-666, 1988.

PASCON, E. A., LEONARDO, M.R., SAFAVI, K., LANGELAND, K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 72: 222-237, 1991.

PAUL, W.E. The immune system: An introduction. In: *Fundamental Immunology*. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

PECORA, J.D. et al. Novo método de diafanização de dentes. *Rev. Fac. Odont. Rib. Preto*. 23(1): 1-5, 1986.

PELUFFO, G., PIACENZA, L., IRIGOIN, F., ALVAREZ, M.N., RADI, R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *TRENDS in Parasitology*. 20(8): 363-69, 2004.

- PERASSI, F.T., FILHO, I.B., BERBERT, F.L., CARLOS, I.Z., de TOLEDO LEONARDO, R. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. *J Endod.* 30(7):534-7, 2004.
- PERSON, N. A. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 8: 12-28, 1996.
- PERTOT, W-J, CAMPS, J., REMUSAT, M., PROUST, J-P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of the rabbits. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.* 73: 613-620, 1992.
- PETERS, D.D. Two-year in vitro solubility evaluation of four Gutta-percha sealer obturation techniques. *J Endod.* 12(4):139-45, 1986.
- PETERS, O.A.; LAIB, A.; RUEGSEGGER, P.; BARBAKOV, F. Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography. *J Dent Res.* 79:1405-09, 2000.
- POE, J. C., WAGNER, D.H., MILLER, R.H., STOUT, R.D., SUTTLES, J. IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1beta synthesis and rescue from apoptosis. *J. Immunol.* 159:846-852, 1997.
- POMMEL, L.; ABOUT, I.; PASHLEY, D.; CAMPS, J. Apical leakage of four endodontic sealers. *J Endod.* 29(3):208-10, 2003.
- PREISWERK, G. Die pulpaamputation, eine klinische, pathohistologische and bakteriologische studie. *Oesterr-ung. V. F. Zahnheilkunde*, 1991, v. XVII, P. 145-220, apud, Barret MT: The internal anatomy of the teeth with special reference to the pulp with its branches. *D Cosmos.* 67: 581-592, 1901.
- PUCCI, F., REIG, R. *Conductos radiculares; anatomia, patologia y terapia.* Buenos Aires: Medico-Quirurgica, Cap. III, p. 144-247, 1945.
- PULGAR, R., SEGURA, J.J., FERNANDEZ, M.F., SERNA, A., OLEA, N. The effect of AH 26 and AH Plus on MCF-7 breast cancer cell proliferation in vitro. *Int Endod J.* 35(6):551-6, 2002.
- RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology.* 5: 85-88, 1995.
- REZENDE, T.M.B., VARGAS, D.L., CARDOSO, E.P., SOBRINHO, A.P.R., VIEIRA, L.Q. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J.* 38:896-903, 2005.
- REZENDE, T.M.B., VIEIRA, L.Q., CARDOSO, F.P., de OLIVEIRA MENDES, S.T., JORGE, M.L.R., RIBEIRO SOBRINHO, A.P. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J.* 40(8):603-11, 2007.

- RIBEIRO SOBRINHO, A.P.; de MELO MALTOS, S.M.; de CARVALHO, M.A.; NICOLI, J.R.; de UZEDA, M.; VIEIRA, L.Q. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *O Microbiol and immunol.* 17:344-353, 2002.
- RIBEIRO-SOBRINHO, A.P., RABELO, F.L., FIGUEIREDO, C.B., ALVAREZ LEITE, J.L.,NICOLI, J.R., UZEDA, M., VIEIRA, L.Q. Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. *J Méd Microbiol.* 54(Pt4):413-6, 2005.
- RICKERT, U.G., DIXON, C. M. The control of root surgery. *Transactions 8 Int Dental Congress*, Section IIIA. n. 9:15-22, 1981.
- ROBERTSON, D., LEEB, J., MCKEE, M., BREWER, E: A cleaning technique for the study of root canal systems. *J Endod.* 6: 421-424, 1980.
- SADEGHEIN, A., BOLHARI, B., SARAFNEJAD, A. A comparison of the effect of three endodontic sealers on adherence of mouse peritoneal macrophages. *J Calif Dent Assoc.* 29(9):673-7, 2001.
- SAFAVI, K. E., SPANGBERG, L. S. W., COSTA, N. S., SAPOUNAS, G. An in vitro method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. *J. Endod.* 15:484-486, 1989.
- SALEH, I.M; RUYTER, I.E.; HAAPASALO, M.; ORSTRAVICK, D. Survival of *Enterococcus faecalis* infected dentinal tubules after root canal filling with diferente root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 37(3):193-8, 2004.
- SAVIOLI, R.N.; PECORA, J.D.; MIAN, H.; ITO, I.Y. Evaluation of the antimicrobial activity of each component in Grossman's sealer. *Braz Oral Res.* 20(2):125-31, 2006.
- SCELZA, M.Z.S., OLIVEIRA, L.R.L., CARVALHO, F.B., FARIA, S.C.R.F. In vitro evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 102:e24-e7, 2006.
- SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am.* 18: 269-296, 1974.
- SCHILDER, H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am.* 11: 723-744, 1967.
- SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, DA. Interferon: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol,* 75:163-89, 2004.
- SEGURA, J. J., CALVO, J. R., GUERRERO, J. M., SAAMPEDRO, C., JIMÉNEZ, A., LLAMAS, R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod.* 22:337-340, 1996.
- SEGURA, J. J., JIMÉNEZ-RUBIO A. Effect of eugenol on macrophage adhesion *in vitro* to plastic surfaces. *Endod Dent Traumatol.* 14: 72-74, 1998.

- SEGURA, J. J., JIMÉNEZ-RUBIO, A., GUERRERO, J. M., CALVO, J. R., Feito J. J. Effect *in vitro* of Tifell (formocresol-eugenol) on macrophage adhesion. *Int Endod J.* 31:112-116, 1998.
- SEGURA J. J., LLAMAS R., RUBIO-MANZANARES, A. J., JIMÉNEZ-PLANAS, A., Guerrero J. M., CALVO, J. R. Calcium hidroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *J. Endod.* 23: 444-447, 1997.
- SHILOH, M.U., MACMICKMING, J.D., NICHOLSON, S., BRAUSE, J.E., POTTER, S., MARINO, M., FANG, F., DINAUER, M., NATHAN, C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 10:29-38, 1999.
- SIEBURTH, D., JABS, E.W.; WARRINGTON, J.A.; LI, X.; LASOTA, J. LaFORGIA, S.; KELLEHER, K.; WASHMUTH, J.J.; WOLF, S.F. Assignment of NKSF/IL-12, a unique cytokine composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics.* 14:59-62, 1992.
- SMITH, M.A., STEIMAN, H.R. An *in vitro* evaluation of microleakage of two new and two old root canal sealers. *J Endod.* 20:18-21, 1994.
- SPANGBERG, L., LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells *in vitro*. *Oral surg.*, 35:402-14, 1973.
- STASHENKO, P. TELES, R. D'SOUZA, R. Periapical Inflammatory responses and their Modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9(4): 498-521, 1998.
- STASHENKO, P. *et al.* The role of immune cytokines in pathogenesis of periapical lesions. *Endodon Dent Traumatol.* 6:89-96, 1990.
- STEIN, M. *et al.* Interleukin 4 potently enhances murine mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 176:287-92, 1992.
- STERN, M., MACKLER, B. F., DREIZEN, S. A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J. Endodon.* 2: 70-74, 1981.
- STERN, A.S.; PODLASKI, F.J.; HULMES, J.D.; PAN-Y, C.E.; QUINN, P.M.; WOLITZ, A.G.; FAMILLETTI, P.C.; STREMLO, D.L. TRUITT, T.; CHIZZONITE, R.; GATELY, M.K. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:6808-12, 1990.
- STEWART, C. M., WATSON, R. E. *Experimental oral foreign body reactions.* 69: 713-9, 1990.
- STOCK, C. J. R. *et al.* *Atlas Colorido e Texto em Endodontia.* 2 ed. Artes Médicas. 291p.,1996.
- STUEHR, D. J.; MARTELLA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 82, p. 7738-7742, 1985.



SUMIMOTO, H., MIYANO, K., TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 388(1): 677-86. Epub, 2005.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 18: 427-30, 1992.

SYRJÄNEN, S., MÖLLER, B., HENSTEN-PETERSEN, A. Macrophage response and hemolytic activity caused by the powder component of endodontic sealers. *J Endod.* 11: 294-300, 1985.

SWANSON, J, A. BAER, S, C. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology* . 5: 89-93, 1995.

TARTAGLIA, L.A., PENNICA, D., GOEDDEL, D.V. Ligand passing: the 75-kDA tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDA TNF receptor. *J Biol Chem.* 268:18542-48, 1993a.

TRINCHIERI, G., GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol.* 59(4):505-11, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Nature Reviews.* 3:133-46, 2003.

TRUSK, M.A., WILSON, M.E., DYKE, K.V. The generation of chemiluminescence by phagocytic cells. In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. *Methods in enzymology.* 1 ed. Londres. Academic Press. V.LVII, cap 39, p.462-93, 1978.

UNANUE, E. R. The regulation of lymphocyte functions by macrophage. *Immunol Rev.* 40: p.228-235, 1978.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825–852, 2002.

van der BURGT, T.P.; PLASSCHAERT, A.J. Tooth discoloration induced by dental materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 60:666, 1985.

van FURTH, R., COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., HUMPREY, J. H., SPECTOR, W.G., LANGEVOOT, H. L. The mononuclear phagocyte system: new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull WHO.* 46: p.845-853, 1972.

VASSALI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 10:411-52, 1992.

VERRECK, F.A. et al. Human IL-23 producing type I macrophages promote but IL-10 producing type II macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 4560-65, 2004.

VICKER, M.G. On the origin of the phagocytic membrana. *Exp Cell Res.* 109:127-38, 1977.

XANTHOULEA, S., PASPARAKIS, M., KOUSTENI, S., BRAKEBUSH, C., WALLACH, D., BAUER, J. LASSMAMM, H., KOLLIAS, G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infections and inflammatory diseases. *The Journal of Experimental Medicine*. 200(3): 367-76, 2004.

XIOMARA, G.; STEIN, F. Nitric Oxide. *Semin Pediatr Infect Dis*. 17:55-7, 2006.

YESILSOY, C., KOREN, L. Z., MORSE, D. R., KOBAYASHI, C. A comparative tissue toxicity evaluation and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 65: 459-467, 1998.

YOSHIMURA, A., MORI, H., OHISHI, M., HANADA, T. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Curr Opin Immunol*. 15(6):704-8, 2003.

WALTON, R. E., JOHNSON, W. T. Obturação. Em: WALTON E. R., TORABINEJAD, M., *Princípios e Prática em Endodontia*. 2ed. São Paulo : Santos Livraria Editora., p.234-259, 1998.

WALTON, R. E., TORABINEJAD, M. *Princípio e prática em Endodontia*. 2 ed. São Paulo: Santos, 558p, 1997.

WATANAKE, K. et al. Eotaxin-2 generation is differentially regulated by lipopolysaccharide and IL-4 in monocytes and macrophages. *J Immunol*. 168: 1911-18, 2002.

WERB, Z.; COHN, Z.A. Plasma-membrana synthesis in the macrophage following phagocytosis polystyrene latex particles. *J Biol Chem*. 247:2439-46, 1972.

WOLF, S. F., TEMPLE, P. A., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., DICIG, M., LOWE, L., DZIALO, R., FITZ, L., FERENZ, C., HEWICK, R. M., KELLEHER, K., HERRMANN, S. H., CLARK, S. C., AZZONI, L., CHAN, S. zH., TRINCHIERI, G., PERUSSIA, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol*. 146: 30743081, 1991.

ZHOU, X., SCHMIDTKE, P., ZEPP, F., MEYER, C.U. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 5(4):465-75, 2005.

ZOREMCHHINGI, J.T.; VARMA, B.; MUNGARA, J. A study of root canal morphology of human primary molars using computadorised tomography: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 23(1):7-12, 2005.

## 9 ANEXOS

TABELA 1 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 aderidas ao vidro, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	149,000	129,00	179,00	26,457
Endofill	82,666	75,00	91,00	8,020
PCS EWT	93,666	85,00	104,00	9,609

TABELA 2 – Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 aderidos ao vidro, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	0,014*	t de student
Controle x PCS EWT	0,027*	t de student

TABELA 3 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 aderidas ao vidro, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	155,000	142,00	164,00	11,532
Endofill	88,666	78,00	97,00	9,712
PCS EWT	106,000	98,00	112,00	7,211

TABELA 4 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 aderidos ao vidro, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	0,002*	t de student
Controle x PCS EWT	0,003*	t de student

TABELA 5 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 e M2 aderidos ao vidro.

Grupos	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	0,735	t de student

TABELA 6 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 com leveduras aderidas, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	248,333	218,00	297,00	42,571
Endofill	272,333	252,00	294,00	21,031
PCS EWT	314,333	294,00	337,00	21,594

TABELA 7 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 com leveduras aderidas, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	0,039* ou 0,431	t de student
Controle x PCS EWT	0,045* ou 0,075	t de student

TABELA 8 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M1 com leveduras fagocitadas, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	323,666	299,00	355,00	28,589
Endofill	347,666	311,00	386,99	37,527
PCS EWT	246,000	225,00	273,00	24,556

TABELA 9 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M1 com leveduras fagocitadas, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	0,066	t de student
Controle x PCS EWT	0,023*	t de student

TABELA 10 – Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 com leveduras aderidas, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	254,000	240,00	268,00	14,000
Endofill	294,333	268,00	318,00	25,106
PCS EWT	278,000	202,00	354,00	76,000

TABELA 11 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 com leveduras aderidas, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	0,072	t de student
Controle x PCS EWT	0,619	t de student

TABELA 12 - Análise descritiva dos experimentos em relação ao número de células M2 com leveduras fagocitadas, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com e sem os cimentos das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas				
Cimento	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	427,666	413,00	441,00	14,047
Endofill	184,333	167,00	202,00	17,502
PCS EWT	232,333	213,00	248,00	17,785

TABELA 13 - Resultados da análise estatística para o número de macrófagos M2 com leveduras fagocitadas, após exposição aos cimentos endodônticos das duas marcas comerciais.

Grupos	Valor p	Teste
Controle x Endofill	<0,001*	t de student
Controle x PCS EWT	<0,001*	t de student

TABELA 14 - Resultados da análise estatística para o número de leveduras aderidas/macrófagos M1 e M2.

Grupos	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	0,837	t de student

TABELA 15 - Resultados da análise estatística para o número de leveduras fagocitadas/macrófagos M1 e M2.

Grupos	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	0,05	t de student

TABELA 16 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U/ml de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas

Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	4,110	1,75	7,26	2,838
	Mo + F	64,515	15,20	96,69	43,364
	Mo + F + I	104,040	93,93	111,69	9,131
Endofill	Mo	2,150	0,73	4,67	2,191
	Mo + F	22,431	7,64	39,70	16,174
	Mo + F + I	81,978	69,79	89,86	10,704
PCS EWT	Mo	2,644	1,18	4,91	1,992
	Mo + F	38,886	4,95	77,99	36,792
	Mo + F + I	84,386	67,00	95,13	15,200

TABELA 17 – Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1 incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais com e sem estímulo das bactérias gram-negativas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .

Grupos	Meio	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,397	t de student
	Mo + F	0,190	t de student
	Mo + F + I	0,053	t de student
Controle x PCS EWT	Mo	0,505	t de student
	Mo + F	0,479	t de student
	Mo + F + I	0,127	t de student

TABELA 18 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *P.anaerobius*/mL (P) com e sem 10U/ml de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas

Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	4,110	1,75	7,26	2,838
	Mo + P	21,240	1,89	48,66	24,407
	Mo + P + I	73,857	52,14	99,64	24,009
Endofill	Mo	2,150	0,73	4,67	2,191
	Mo + P	9,072	5,15	1,57	3,438
	Mo + P + I	67,741	53,21	84,49	15,754
PCS EWT	Mo	2,644	1,18	4,91	1,992
	Mo + P	4,654	2,81	7,78	2,719
	Mo + P + I	51,089	41,82	57,32	8,183

TABELA 19 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1 incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais com e sem estímulo das bactérias gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .

Grupos	Meio	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,491	t de student
	Mo + P	0,441	t de student
	Mo + P + I	0,731	t de student
Controle x PCS EWT	Mo	0,217	t de student
	Mo + P	0,513	Mann-Whitney
	Mo + P + I	0,195	t de student

TABELA 20 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U/ml de IFN- $\gamma$  (I)

Medidas descritivas

Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	30,725	21,22	38,04	8,621
	Mo + F	63,864	58,22	69,43	5,603
	Mo + F + I	79,297	75,13	83,46	4,166
Endofill	Mo	0,482	0,39	0,64	0,134
	Mo + F	39,963	39,51	40,79	0,716
	Mo + F + I	48,098	43,77	54,14	5,390
PCS EWT	Mo	0,996	0,82	1,17	0,175
	Mo + F	43,099	39,15	48,14	4,589
	Mo + F + I	38,392	37,00	40,92	2,195



TABELA 21 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M2 incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais com e sem estímulo das bactérias gram-negativas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .

Grupos	Meio	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,056	t de student
	Mo + F	0,002*	t de student
	Mo + F + I	<0,001*	t de student
Controle x PCS EWT	Mo	0,060	t de student
	Mo + F	0,008*	t de student
	Mo + F + I	<0,001*	t de student

TABELA 22 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, após 72 horas de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) com e sem 10U/ml de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas

Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	5,307	3,91	6,82	1,455
	Mo + P	11,351	7,26	17,67	3,942
	Mo + P + I	96,383	33,11	167,36	67,454
Endofill	Mo	4,356	1,58	5,82	2,403
	Mo + P	8,27	4,57	6,11	1,011
	Mo + P + I	28,217	19,69	39,52	10,202
PCS EWT	Mo	3,773	3,07	4,31	0,632
	Mo + P	4,949	4,25	6,11	1,011
	Mo + P + I	17,871	7,81	35,33	15,166

TABELA 23 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M2 incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais com e sem estímulo das bactérias gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .

Grupos	Meio	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,057	t de student
	Mo + P	0,477	t de student
	Mo + P + I	0,159	t de student
Controle x PCS EWT	Mo	0,062	t de student
	Mo + P	0,057	Mann-Whitney
	Mo + P + I	0,121	t de student

TABELA 24 - Resultado da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1/M2 com e sem estímulo das bactérias gram-negativas e gram-positivas, acrescidas e não de IFN- $\gamma$ .

Grupos	Meio	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	Mo	0,551	t de student
	Mo + F	0,07	t de student
	Mo + F + I	0,013	Mann-Whitney
	Mo + P	0,531	t de student
	Mo + P + I	0,615	t de student

TABELA 25 - Medidas descritivas da produção de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva) pelos macrófagos M1 pré-incubados com os capilares, contendo ou não os cimentos das diferentes marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de  $10^7$  partículas de zymosan/mL.

Medidas descritivas

Cimento	Estímulo	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Sem zymosan	83866,27	86241	102112	5325,75
	Com zymosan	194556,5	115897,5	329855	78559
Endofill	Sem zymosan	176869,11	714519	129112	19808,98
	Com zymosan	119349,5	112138,5	191958,5	38898,02
PCS EWT	Sem zymosan	71430,80	59064	76234	5917,040
	Com zymosan	121983	92683,5	205532	57763

TABELA 26 - Resultados da análise estatística da produção de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva) de macrófagos M1 pré incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais, com e sem estímulo do zymosan.

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Sem zymosan	0,05	Mann-Whitney
	Com zymosan	0,05	Mann-Whitney
Controle x PCS EWT	Sem zymosan	0,043	t de student
	Com zymosan	0,024	t de student

TABELA 27 - Medidas descritivas da produção de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva) pelos macrófagos M2 pré-incubados com os capilares, contendo ou não os cimentos da diferentes marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de  $10^7$  partículas de zymosan/mL.

Medidas descritivas

Cimento	Estímulo	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Sem zymosan	103876,27	98241	109512	5635,75
	Com zymosan	234896,5	145337,5	324455,5	89559,0
Endofill	Sem zymosan	103869,17	84519	135612	27708,94
	Com zymosan	159579,7	105238,5	202058,5	49488,02
PCS EWT	Sem zymosan	86430,50	82064	94286	6817,036
	Com zymosan	151283	102883,5	206534	52163,82

TABELA 28 - Resultados da análise estatística da produção de ROIs (representada pelo cálculo da área sob a curva) de macrófagos M2 pré incubados com os cimentos endodônticos das duas marcas comerciais, com e sem estímulo do zymosan.

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Sem zymosan	1	t de student
	Com zymosan	0,271	t de student
Controle x PCS EWT	Sem zymosan	0,027	t de student
	Com zymosan	0,235	t de student

TABELA 29 - Resultado da análise estatística para a produção de ROIs (área sob a curva) de macrófagos M1/M2 com e sem estímulo de zymosan.

Grupos	Meio	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	Com zymosan	0,05	Mann-Whitney
	Sem zymosan	0,05	Mann-Whitney

TABELA 30 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-12 p70 por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U de IFN- $\gamma$  e  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas					
Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
controle	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	69,2373	65,18	71,34	3,51190
	Mo + F + I	89,6187	76,64	99,85	11,84566
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	64,4107	58,93	68,20	4,85881
	Mo + P + I	85,5437	74,01	98,67	12,40811
Endofill	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	68,1477	63,10	70,92	4,37484
	Mo + F + I	84,7887	73,35	96,09	11,36608
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	66,5777	64,06	69,37	2,66406
	Mo + P + I	70,8637	58,67	77,32	10,56699
PCS EWT	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	69,0513	63,35	71,93	4,94187
	Mo + F + I	79,7053	70,54	86,94	8,36608
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	66,6957	63,31	70,91	3,86620
	Mo + P + I	79,1077	66,51	86,14	10,93709

\* valores abaixo do nível de detecção

TABELA 31 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-12p70 de macrófagos M1 incubados por 24h, com os cimentos das duas marcas comerciais com e sem a presença das bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo + F	0,400	Mann-Whitney
	Mo + F + I	0,637	t de student
	Mo + P	0,535	t de student
	Mo + P + I	0,194	t de student
Controle x PCS EWT	Mo + F	0,700	Mann-Whitney
	Mo + F + I	0,302	t de student
	Mo + P	0,559	t de student
	Mo + P + I	0,537	t de student

TABELA 32 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U de IFN- $\gamma$  e  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas					
Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	1163,8133	998,76	1293,81	150,61658
	Mo + F	3384,6023	2007,88	5707,67	1407,130
	Mo + F + I	4929,2833	2169,89	8790,25	2378,336
	Mo	1018,8597	923,14	1141,33	111,52796
	Mo + P	2310,3583	1177,82	3947,99	885,42633
	Mo + P + I	3838,8891	1973,04	7177,18	1722,482
Endofill	Mo	1563,5200	1371,50	1761,17	194,89600
	Mo + F	3533,9324	1977,33	6123,80	1449,071
	Mo + F + I	4187,0445	1909,06	6873,91	1829,807
	Mo	1029,2810	779,29	1212,53	224,19667
	Mo + P	2310,3583	1177,82	3947,99	885,42633
	Mo + P + I	2767,0480	1801,77	4047,30	942,62007
PCS EWT	Mo	2822,5726	2023,52	3706,25	626,58796
	Mo + F	3533,9324	1977,33	6123,80	1449,071
	Mo + F + I	3838,8891	1973,04	7177,18	1722,482
	Mo	1204,0400	1038,50	1435,80	206,76228
	Mo + P	2482,1580	1663,08	3420,37	745,79483
	Mo + P + I	2822,5726	2023,52	3706,25	626,58796

TABELA 33 – Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 incubados por 24h, com os cimentos das duas marcas comerciais com e sem a presença das bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,311	t de student
	Mo + F	0,591	t de student
	Mo + F + I	0,306	t de student
	Mo	0,167	t de student
	Mo + P	0,066	t de student
	Mo + P + I	0,050	Mann-Whitney
Controle x PCS EWT	Mo	0,163	t de student
	Mo + F	0,034	t de student
	Mo + F + I	0,119	Mann-Whitney
	Mo	0,050	t de student
	Mo + P	0,056	t de student
	Mo + P + I	0,050	t de student

TABELA 34 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M2, após 24h de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U de IFN- $\gamma$  e  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas					
Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
Controle	Mo	1611,9600	1547,08	1703,93	81,85891
	Mo + F	3384,6023	2007,88	5707,67	1407,130
	Mo + F + I	4187,0445	1909,06	6873,91	1829,807
	Mo	1204,0400	1038,50	1435,80	206,76228
	Mo + P	2822,5726	2023,52	3706,25	626,58796
	Mo + P + I	3838,8891	1973,04	7177,18	1722,482
Endofill	Mo	1161,8267	1109,48	1253,89	79,97889
	Mo + F	2219,3418	1106,92	3735,00	832,27795
	Mo + F + I	3384,6023	2007,88	5707,67	1407,130
	Mo	1227,0623	800,96	1849,14	550,99635
	Mo + P	2429,8796	1923,47	2923,10	378,25022
	Mo + P + I	2822,5726	2023,52	3706,25	626,58796
PCS EWT	Mo	1018,8597	923,14	1141,33	111,52796
	Mo + F	2310,3583	1177,82	3947,99	885,42633
	Mo + F + I	4929,2833	2169,89	8790,25	2378,336
	Mo	1658,4783	875,82	2299,59	722,36519
	Mo + P	2491,8211	1837,78	3662,94	571,20413
	Mo + P + I	3384,6023	2007,88	5707,67	1407,130



TABELA 35 – Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M2 incubados por 24h, com os cimentos das duas marcas comerciais com e sem a presença das bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo	0,246	t de student
	Mo + F	0,378	t de student
	Mo + F + I	0,026	t de student
	Mo	0,167	t de student
	Mo + P	0,066	t de student
	Mo + P + I	0,050	Mann-Whitney
Controle x PCS EWT	Mo	0,378	t de student
	Mo + F	0,403	t de student
	Mo + F + I	0,034	t de student
	Mo	0,050	Mann-Whitney
	Mo + P	0,056	t de student
	Mo + P + I	0,050	Mann-Whitney

TABELA 36 – Resultados na análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 e M2 incubados por 24h, estimulados com as bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	Mo	0,160	t de student
	Mo + F	0,080	t de student
	Mo + F + I	0,090	t de student
	Mo	0,777	t de student
	Mo + P	0,099	t de student
	Mo + P + I	0,050	Mann-Whitney

TABELA 37 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M1, após 72h de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U de IFN- $\gamma$  e  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas					
Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
	Mo	*	*	*	-
Controle	Mo + F	1658,4783	875,82	2299,59	722,36519
	Mo + F + I	1067,0893	647,67	1507,05	430,05901
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	1029,2810	779,29	1212,53	224,19667
	Mo + P + I	675,1000	411,89	897,77	245,45981
	Mo	*	*	*	-
Endofill	Mo + F	1351,6253	843,09	1802,68	482,37281
	Mo + F + I	880,6020	612,36	1196,20	294,78675
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	926,5660	667,28	1128,39	235,86374
	Mo + P + I	741,0663	565,15	898,97	167,63689
	Mo	*	*	*	-
PCS EWT	Mo + F	1227,0623	800,96	1849,14	550,99635
	Mo + F + I	775,3527	566,18	1164,42	337,26010
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	808,1860	649,97	999,49	177,267442
	Mo + P + I	509,5647	441,63	641,21	114,02355

\* valores abaixo do nível de detecção

TABELA 38 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 incubados por 72h, com os cimentos das duas marcas comerciais com e sem a presença das bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo + F	0,853	t de student
	Mo + F + I	0,917	t de student
	Mo + P	0,614	t de student
	Mo + P + I	0,720	t de student
Controle x PCS EWT	Mo + F	0,872	t de student
	Mo + F + I	0,545	t de student
	Mo + P	0,251	t de student
	Mo + P + I	0,513	Mann-Whitney

TABELA 39 - Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M2, após 72h de incubação, na ausência e presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de  $10^7$  UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U de IFN- $\gamma$  e  $10^7$  UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- $\gamma$  (I).

Medidas descritivas					
Cimento	Meio	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-Padrão
	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	1611,9600	1547,08	1703,93	81,85891
Controle	Mo + F + I	1228,7000	1087,27	1462,14	203,66949
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	1302,5633	1203,68	1399,62	97,98277
	Mo + P + I	1018,8597	923,14	1141,33	111,52796
	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	1563,5200	1371,50	1761,17	194,89600
Endofill	Mo + F + I	1204,0400	1038,50	1435,80	206,76228
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	1215,5910	995,58	1408,05	207,60893
	Mo + P + I	1163,8133	998,76	1293,81	150,61658
	Mo	*	*	*	-
	Mo + F	1568,3700	1451,26	1678,03	113,56842
PCS EWT	Mo + F + I	1079,7167	1019,70	1130,63	56,02249
	Mo	*	*	*	-
	Mo + P	1081,0357	999,85	1172,70	86,90135
	Mo + P + I	1161,8267	1109,48	1253,89	79,97889

\* valores abaixo do nível de detecção

TABELA 40 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M2 incubados por 72h, com os cimentos das duas marcas comerciais com e sem a presença das bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius* também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
Controle x Endofill	Mo + F	0,712	t de student
	Mo + F + I	0,890	t de student
	Mo + P	0,548	t de student
	Mo + P + I	0,251	t de student
Controle x PCS EWT	Mo + F	0,618	t de student
	Mo + F + I	0,289	t de student
	Mo + P	0,043	t de student
	Mo + P + I	0,146	t de student

TABELA 41 – Resultados na análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 e M2 incubados por 72h, estimulados com as bactérias *F. nucleatum* com e sem IFN- $\gamma$  e *P. anaerobius*, também com e sem IFN- $\gamma$ .

Grupos	Estímulo	Valor p	Teste
controle M1 X controle M2	Mo + F	0,012	t de student
	Mo + F + I	0,096	t de student
	Mo + P	0,125	t de student
	Mo + P + I	0,092	t de student