

TAIA MARIA BERTO REZENDE

“Efeito do MTA (Agregado de Trióxido Mineral) sobre a atividade de macrófagos peritoneais”.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2003

TAIA MARIA BERTO REZENDE

“Efeito do MTA (Agregado de Trióxido Mineral) sobre a atividade de macrófagos peritoneais”.

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Antônio Paulino R. Sobrinho
Leda Quercia Vieira

BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2003

Efeito do MTA (Agregado de trióxido mineral) sobre a atividade de macrófagos peritoneais. Belo Horizonte, Faculdade de Odontologia, UFMG, 2003. ix. 30 P. 176.

Tese: Mestrado em Odontologia (Área de concentração: Endodontia)

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| 1. MTA | 2. Biocompatibilidade |
| 3. Tipo de macrófagos | 4. Resposta imune pulpar |
| 5. Resposta imune periapical | 5. Camundongos “knockouts” |

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – FO

I. Título

*“Não cessaremos de explorar
E ao fim de nossa exploração
Voltaremos ao ponto de partida
Como se não o tivéssemos conhecido”*

T. S. Eliot

DEDICATÓRIA

À minha família,

*Aos meus pais **Walter e Taia**, meus primeiros e verdadeiros mestres, que tantas vezes abdicaram de si mesmos para que eu pudesse realizar os meus sonhos, apoiando-me de forma incondicional. Com vocês tudo faz sentido. Recomeçaria tudo e sei que vocês também. Muito obrigada.*

*Ao meu noivo **André**, meu companheiro, incentivador de minhas empreitadas, motivação para todas as minhas buscas, pelo que representa em minha vida. Amo você.*

*Às minhas avós **Mari-inha e Hildette**, pela jovialidade, presença, amor, confiança e apoio constantes à minha procura de conhecimentos e conquistas.*

*Às minhas irmãs **Juliane e Lectícia** que me incentivam e torcem por mim, de longe ou de perto.*

*À minha tia **Lourdinha** in memoriam, por todo incentivo, carinho, companheirismo, pelo que me ensinou sobre a vida, em tão pouco tempo.*

*A toda a minha família: **tios, tias, primos, primas**, pela atenção e por terem me recebido de braços abertos como verdadeira filha.*

Por acreditarem sempre em mim. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pela orientação segura, estímulo constante, que me ajudaram a crescer.

À professora Doutora Leda Quercia Vieira, pela sua atenção, equilíbrio, paciência, orientação e disponibilidade, em todas as etapas desta empreitada. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de mestrado em Odontologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao laboratório de Gnotobiologia e Nutrição, que cedeu o material e as instalações para a realização desta pesquisa.

Às empresas Odonto-lógica e Tulsa Dental, por terem cedido o MTA para este estudo.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos transmitidos de maneira primorosa durante todo o curso.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de felicidade e árduo trabalho que dividimos.

À Luciana e a Ana Cristina, verdadeiras amigas de risos e choros, pelos sorrisos que amenizaram a distância da família e a superar os momentos difíceis.

À professora, Doutora Rosa Arantes, do departamento de patologia do ICB, pelas fotografias e sugestões importantes para o melhor resultado deste trabalho.

Ao Professor, Doutor Jacques Nicoli, do departamento de microbiologia, por todo carinho, pela presença e por todas as sugestões para esta pesquisa.

Às professoras Maria Ilma e Juliana Vilela, por tudo que me ensinaram na clínica de traumatismo, e durante todo o curso.

*Aos alunos de iniciação científica, **Débora Vargas** e **Fabiano Cardoso**, por todo o carinho, ajuda, e alegres momentos de convivência.*

*Aos meus colegas de laboratório, **Denise Fonseca**, **Helton Santiago** e **Marcelo José**, pela parceria nos meus primeiros passos na Imunologia e na fase experimental desta pesquisa.*

*Aos meus colegas de grupo de estudo, **Claudinha**, **Juliana Reis**, **Rinaldo** e **Fernando**, pela seriedade, sugestões e incentivo em todos os momentos.*

*À professora **Carla Santana de Miranda Coelho**, responsável pela minha iniciação científica e decisão de ingressar no mestrado.*

*À professora **Doutora, Vera Miranda de Lima Sant'anna** e a Diretora da FOPLAC **Sandra Aparecida dos Santos**, pela confiança em mim depositada.*

*Aos meus amigos **Fernando Campos**, **Patrícia Ruiz** e **Rivadávio Amorim**, pela amizade, companheirismo e lealdade sempre confirmados.*

*Aos meus sócios, **Sane Alessandra** e **Roney Correia**, pela compreensão e competência na continuidade de nosso trabalho.*

*À funcionária **Goreth**, do laboratório de microbiologia, pela seriedade e ajuda, sempre.*

*Ao Sr. **Ricardo Ferracini** e toda a equipe do **Centro de Desenvolvimento Tecnológico**, pela eficiente colaboração.*

*Às instituições que possibilitaram minha capacitação, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** e **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**.*

A todos que, de alguma forma contribuíram para meu êxito diante, de mais um desafio.

*A **Deus** por me oferecer todos os motivos para agradecer.*

Meus singelos e sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	32
2 REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1 Inflamação e resposta imune	35
2.2 Citocinas	39
2.2.1 Fator de necrose tumoral (TNF)	41
2.2.2 Interleucina-12	43
2.2.2.1 Camundongos IL-12 knockout (IL-12p40 ^{-/-})	45
2.2.3 Interleucina-10	45
2.3 Fagócitos	46
2.4 Macrófagos	47
2.5 Fagocitose	51
2.6 Radicais livres de oxigênio (ROIs)	53
2.7 Óxido nítrico (NO)	55
2.8 Resposta dos tecidos pulpaes à infecção bacteriana	57
2.9 Resposta do tecido perirradicular à infecção bacteriana	59
2.10 Macrófagos nas lesões periapicais	62
2.11 MTA	63
2.11.1 Propriedades físico-química	65
2.11.2 Propriedades antimicrobianas	67
2.11.3 Citotoxicidade	69
2.11.5 Indicações	72
3 OBJETIVO	74
3.1 Objetivo geral	74
3.2 Objetivos específicos	74
4 MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.1 Caracterização do estudo	76
4.2 Plano Amostral	76
4.3 Animais e Microorganismos	77
4.4 Preparo do MTA	80
4.5 Obtenção e cultura de células peritoneais inflamatórias	81
4.6 Viabilidade celular	82
4.7 Aderência de macrófagos ao substrato	83
4.8 Fagocitose da levedura <i>S. boulardii</i> <i>in vitro</i>	83
4.8.1 Coloração com Panótico Rápido	85
4.8.2 Propriedade corante das leveduras	85

4.9 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF)	86
4.10 Detecção de Interleucina-12 (IL-12)	87
4.11 Detecção de Interleucina-10 (IL-10)	88
4.13 Detecção de radicais livres de oxigênio (RLOs)	90
4.13 Detecção de Óxido Nítrico (NO).....	91
4.14 Análises estatísticas	92
5 RESULTADOS	94
5.1 Viabilidade celular.....	94
5.1.1 Viabilidade celular em tubos de polipropileno.....	94
5.1.2. Viabilidade celular em placa de 24 poços	97
5.2 Aderência celular	99
5.3 Fagocitose.....	101
5.4 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF)	108
5.5 Detecção de Interleucina-12 (IL-12)	111
5.6 Detecção de Interleucina-10 (IL-10)	113
5.7 Detecção de radicais livres de oxigênio (ROIs)	115
5.8 Detecção de Óxido Nítrico (NO).....	118
6 DISCUSSÃO	121
7 CONCLUSÃO.....	138
SUMMARY	141
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	143
ANEXOS	158

LISTAS

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6) vivos, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares, com ou sem o MTA das duas marcas comerciais. T indica o erro padrão..... 96
- GRÁFICO 2 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) vivos, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares, com ou sem o MTA das duas marcas comerciais. T indica o erro padrão..... 96
- GRÁFICO 3 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6) vivos após 12, 24 e 48 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem MTA das duas marcas comerciais. O resultado é a média de 3 experimentos realizados em duplicatas. $\ast p < 0,05$ comparando o cimento MTA-Ângelus no tempo de 24h para os macrófagos M1, com o mesmo cimento e tempo para os macrófagos M2 (vide gráfico abaixo). T indica o erro padrão..... 98
- GRÁFICO 4 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) vivos após 12, 24 e 48 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem MTA das duas marcas comerciais. O resultado é a média de 3 experimentos realizados em duplicatas. $\ast p < 0,05$ comparando o cimento MTA-Ângelus no tempo de 24h para os macrófagos M1, com o mesmo cimento e tempo para os macrófagos M2. T indica o erro padrão..... 98
- GRÁFICO 5 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), aderentes e não aderentes, após 2 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 100
- GRÁFICO 6 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), aderentes e não aderentes após 2 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 100
- GRÁFICO 7 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), com levedura aderida e fagocitada, após 1 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10⁷ leveduras/mL de *S. boulardii*. O

resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 103

GRÁFICO 8 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), com leveduras aderidas e fagocitadas, após 1 hora de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10⁷ leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 103

GRÁFICO 9 – Número de leveduras fagocitadas/macrófago M1 (camundongos C57BL/6), após 1 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10⁷ leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 104

GRÁFICO 10 – Número de leveduras fagocitadas/macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 1 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10⁷ leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão..... 104

GRÁFICO 11 – Produção de TNF por culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10⁷ UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10⁷ UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados independentemente. * p<0,05 comparando o grupo dos macrófagos apenas com os capilares com o dos macrófagos com *P. anaerobius*, IFN- γ e os capilares. Sensibilidade do teste: 31,2pg/mL. T indica o erro padrão..... 110

GRÁFICO 12 – Produção de TNF por culturas de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10⁷ UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10⁷ UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados independentemente. *, \circ , Δ , \square p<0,05 quando comparados os grupos indicados. Sensibilidade do teste: 31,2pg/mL. T indica o erro padrão..... 110

GRÁFICO 13 – Produção de IL-12p70 em culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 24h de incubação, na presença ou ausência dos

cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P), com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. - - - indica a sensibilidade do teste (23,4pg/mL). ND indica produção abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão..... 112

GRÁFICO 14 – Produção de IL-10 por culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 72h de incubação, na presença ou ausência dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados em duplicata. \sphericalangle p<0,05 comparando o grupo dos macrófagos estimulados com *F. nucleatum*, e com os capilares entre os macrófagos M1 e M2 (vide gráfico abaixo). Sensibilidade do teste: 15,6pg/mL. ND indica abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão..... 114

GRÁFICO 15 – Produção de IL-10 por culturas de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados em duplicata. \square p<0,05 comparando o grupo do macrófago estimulado com *F. nucleatum* e os capilares e os demais grupos do M2. \sphericalangle p<0,05 comparando o grupo dos macrófagos estimulados com *F. nucleatum* e os capilares para os macrófagos M1 e M2. Sensibilidade do teste: 15,6pg/mL. ND indica produção abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão..... 114

GRÁFICO 16 – Cinética da produção de ROIs por macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL. O resultado é a média de seis experimentos realizados em duplicata..... 116

GRÁFICO 17 – Produção de ROIs por macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), pré-incubados com ou sem os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL, no pico de sua produção. O resultado é a média de seis experimentos realizados em duplicata. *, \diamond , \square p<0,05 em relação aos grupos com e sem zymosan. T indica o erro padrão..... 116

GRÁFICO 18 – Cinética da produção de ROIs por macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos por

24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL. O resultado é a média de quatro experimentos realizados em duplicata..... 117

GRÁFICO 19 - Produção de ROIs por macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), pré-incubados, com ou sem os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL, no pico de sua produção. O resultado é a média de quatro experimentos realizados em duplicata. *, \diamond , \square p<0,05 em relação aos grupos com e sem zymosan. T indica o erro padrão..... 117

GRÁFICO 20 – Produção de NO₂⁻ na cultura de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. * p<0,05 em relação aos grupos com presença das bactérias e IFN- γ . Sensibilidade do teste: 0,05 μ M. T indica o erro padrão..... 119

GRÁFICO 21 – Produção de NO₂⁻ na cultura de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 72h, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. * p<0,05 em relação aos demais grupos. Sensibilidade do teste: 0,05 μ M. T indica o erro padrão..... 119

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares vazios, apresentando leveduras fagocitadas em tom rosa (vide seta) e leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 105
- FIGURA 2 – Macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) em contato com capilares vazios, apresentando muitas leveduras fagocitadas em tom rosa e poucas leveduras aderidas em tom violeta. Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 105
- FIGURA 3 – Macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) em contato com capilares com ProRoot, apresentando muitas leveduras fagocitadas em tom azul claro e poucas leveduras aderidas em tom violeta. Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 106
- FIGURA 4 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com MTA-Ângelus, apresentando algumas leveduras fagocitadas em tom rosado e muitas leveduras aderidas em tom violeta. Presença de estruturas birrefringentes próximas à estrutura das leveduras (vide seta). Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 106
- FIGURA 5 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com MTA-Ângelus, apresentando algumas leveduras fagocitadas em tom rosado e muitas leveduras aderidas em tom violeta. Presença de estruturas birrefringentes próximas à estrutura das leveduras (vide seta). Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 107
- FIGURA 6 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com ProRoot, apresentando algumas leveduras aderidas em tom violeta. Aumento de 1000x em objetiva de imersão..... 107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 viáveis, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	159
TABELA 2 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 viáveis, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	159
TABELA 3 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 viáveis, após 24h de exposição ao MTA das duas marcas comerciais.....	159
TABELA 4 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 viáveis, após 24, 48 e 72 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	160
TABELA 5 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 viáveis, após 24, 48 e 72 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	160
TABELA 6 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 viáveis, após 24, 48 e 72h de exposição ao MTA das duas marcas comerciais.....	161
TABELA 7 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 aderidas, após 2 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	161
TABELA 8 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 aderidas, após 2 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	162
TABELA 9 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 aderentes, após exposição ao MTA das duas marcas comerciais.....	162

TABELA 10 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de macrófagos M1, com leveduras fagocitadas, leveduras aderidas, e o número de leveduras fagocitadas/número de células, após 1 hora de incubação com <i>S. boulardii</i> , na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	163
TABELA 11 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de macrófagos M2 com leveduras fagocitadas, com leveduras aderidas, e o número de leveduras fagocitadas/número de células, após 1 hora de incubação com <i>S. boulardii</i> , na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.....	164
TABELA 12 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 com leveduras fagocitadas.....	164
TABELA 13 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 com leveduras aderidas.....	165
TABELA 14 – Resultados da análise estatística para o número de leveduras fagocitadas/macrófagos M1 e M2.....	165
TABELA 15 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de 10^7 UFC de <i>F. nucleatum</i> /mL (F) com e sem 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de <i>P. anaerobius</i> /mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).....	166
TABELA 16 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M2, após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de 10^7 UFC de <i>F. nucleatum</i> /mL (F) com e sem 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de <i>P. anaerobius</i> /mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).....	167
TABELA 17 – Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 e M2 incubados com os cimentos das duas marcas comerciais, com e sem a presença das bactérias gram-positivas e gram-negativas, acrescidas e não de IFN- γ	168
TABELA 18 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-	

12p70 por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com ou sem 10U de IFN- γ (I)..... 169

TABELA 19 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-12p70 de macrófagos (Mo) M1 incubados por 24h, com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem a presença da bactéria *F. nucleatum* com e sem IFN- γ recombinante e da bactéria *P. anaerobius* também com e sem IFN- γ 170

TABELA 20 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M1, após 72h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I)..... 171

TABELA 21 – 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I)..... 172

TABELA 22 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 e M2 incubados por 72h, com os cimentos das duas marcas comerciais e na ausência e presença da bactéria *F. nucleatum* com e sem IFN- γ recombinante e da bactéria *P. anaerobius* também com e sem IFN- γ 172

TABELA 23 – Medidas descritivas dos picos de produção de ROIs pelos macrófagos M1 pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos das duas marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL..... 173

TABELA 24 – Medidas descritivas dos picos de produção de ROIs pelos macrófagos M2 pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos das duas marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL..... 173

TABELA 25 – Resultados da análise estatística da produção de ROIs de macrófagos M1 e M2 pré-incubados com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem estímulo do zymosan, no pico de sua produção..... 174

TABELA 26 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de 10^7 *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U/mL de IFN- γ (I)..... 174

TABELA 27 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, após 72h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U/mL de IFN- γ (I)..... 175

TABELA 28 – Resultados da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1 e M2 incubados com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem estímulo das bactérias gram-positivas e gram-negativas, acrescidas e não de IFN- γ 175

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Cópia da autorização do CETEA (Comitê de ética em experimentação animal) para realização da pesquisa.....	176
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. ABTS: ácido azinobistiozolinio sulfônico
2. ANOVA: análise de variância
3. APC: célula apresentadora de antígeno
4. ATCC: *American Type Collection*
5. BHI: *Brain heart infusion broth*
6. BSA: albumina bovina
7. CD4: cluster of differentiation 4
8. CD8: cluster of differentiation 8
9. C3b: produto da clivagem pela C3 convertase do componente C3 do complemento
10. DMSO: dimetil sulfóxido
11. EDTA: ácido etilenodiamina tetra-acético
12. ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay
13. eNOS: óxido nítrico sintase de células endoteliais
14. Fc: fragmento cristalizável
15. FDA: *Food and Drug Administration*
16. GM-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos
17. GMPc: guanosina monofosfato cíclico
18. IL-: interleucina
19. IFN-: interferon
20. IgA: imunoglobulina A
21. IgE: imunoglobulina E
22. IgG: imunoglobulina G
23. iNOS: óxido nítrico sintase indutível
24. IRM[®]: *intermediate restorative material*
25. LPS: lipopolissacáride
26. M1: macrófago do tipo 1
27. M2: macrófago do tipo 2
28. MEV: microscópio eletrônico de varredura
29. MHC: complexo principal de histocompatibilidade
30. MTA: *Mineral trioxide aggregate*
31. nNOS: óxido nítrico sintase de células neurais
32. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
33. NK: *natural Killer*
34. NO: óxido nítrico
35. NOS: óxido nítrico sintetase
36. NOS1: vide nNOS
37. NOS2: vide iNOS
38. PHC: pasta de hidróxido de cálcio
39. PBS: tampão salina-fosfato
40. PMN: leucócitos polimorfonucleares
41. ROIs: radicais livres de oxigênio

42. SBF: soro bovino fetal
43. SCR: sistema de canais radiculares
44. SFT: solução de fosfato tamponada
45. Super-EBA[®]: cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado
46. TCF: receptores de células T
47. TGF- β : fator de crescimento transformante
48. Th: célula T-helper
49. TNF: fator de necrose tumoral
50. ZOE: cimentos a base de óxido de zinco e eugenol

RESUMO

RESUMO

O agregado de trióxido mineral (MTA), por ser um cimento retrobturador utilizado em regiões inflamadas e/ou infectadas, deve ser biocompatível e não interferir na atividade dos macrófagos. Recentes estudos diferenciam os macrófagos de acordo com o tipo de resposta: M1 (ativados pela produção de IL-12); M2 (ativados alternativamente pela ausência de IL-12). Neste estudo, testou-se o efeito de duas marcas comerciais do MTA (ProRoot, gentilmente cedido pela Tulsa Dental, Ballaigues, Suíça e MTA-Ângelus, gentilmente cedido pela Odonto-lógica, Londrina, Brasil) sobre a atividade de macrófagos inflamatórios peritoneais M1 (provenientes de camundongos C57BL/6) e M2 (provenientes de camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}). Foram avaliadas: a viabilidade e aderência celular, a fagocitose da *Saccharomyces boulardii*, a produção de ROIs, quando os macrófagos foram estimulados e não com zymosan, e a produção de TNF, IL-12, IL-10 e NO, quando estimulados e não com *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobious*, com e sem IFN- γ . Os cimentos não interferiram nos parâmetros analisados da atividade dos macrófagos M1 e M2. Porém, quando se compararam os macrófagos M2 com os M1, pode-se observar: os macrófagos M2 sobreviveram menos, nos experimentos de viabilidade celular em tubos de polipropileno; apresentaram maior número de leveduras fagocitadas; tiveram maior produção de IL-10, quando estimulados com *F. nucleatum*; produziram menos ROIs. Nos demais parâmetros analisados, não houve diferenças significativas entre ambos. Conclui-se que os cimentos não inibem a resposta pró-inflamatória dos macrófagos M1 e M2; as respostas desses dois tipos celulares diferenciam-se em alguns aspectos.

1 INTRODUÇÃO

O Agregado de trióxido mineral é um material que foi desenvolvido pelo Dr. Mahamoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda, CA – EUA. Foi utilizado experimentalmente em animais, com sucesso, posteriormente por endodontistas, e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) – EUA, em 1998 (Torabinejad *et al.*, 1993). O MTA é um pó constituído de partículas hidrofílicas de silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato, cuja presa se relaciona à presença de umidade. Suas características dependem do tamanho das partículas, relação água/pó e presença de água (Abedi & Ingle, 1995; Schwartz *et al.*, 1999). Atualmente, esse produto é fabricado e comercializado por duas empresas: a Tulsa Dental, com o nome de ProRoot[®]; e a Odonto-lógica, no Brasil, com o nome de MTA-Ângelus[®].

Desde sua primeira descrição, por Lee *et al.* (1993), o MTA é utilizado em aplicações cirúrgicas e não cirúrgicas. Parece ser o material com melhores propriedades para aplicações em cirurgias pararendodônticas que envolvem reparos radiculares e formação óssea, quando comparado com outros materiais já conhecidos: amálgama, *intermediate restorative material* (IRM[®]), ionômero de vidro, cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado (Super-EBA[®]). O MTA tem sido ideal para se aplicar junto ao osso, por ser o único que, consistentemente, permite a deposição do cimento, a formação óssea e ainda facilita a regeneração do ligamento periodontal (Schwartz *et al.*, 1999).

Como o MTA geralmente é aplicado sobre feridas cirúrgicas, infectadas ou não, é importante que o material seja biocompatível, não interfira na resposta imunológica e especificamente, na atividade dos macrófagos. Os tecidos pulpares e perirradiculares inflamados

apresentam uma variedade de células imunocompetentes, sendo os macrófagos as células predominantes (Stern *et al.*, 1981; Kawashima *et al.*, 1996). Os macrófagos desempenham o papel principal na patogênese da inflamação (Van Furth *et al.*, 1972; Unanue, 1978). São uma das primeiras células a entrar em contato com partículas estranhas presentes nos tecidos, e sua principal função é a fagocitose e a digestão das mesmas.

Recentes estudos evidenciaram que os macrófagos podem ser de 2 tipos, baseando-se em sua habilidade de produzir diferentes respostas (Mosser *et al.*, 2000): M1 e M2. A polarização M1/M2 é diferenciada pelos níveis da Interleucina-12.

Como o MTA foi incorporado recentemente ao arsenal endodôntico, existem poucos estudos que avaliam seus efeitos sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999).

Neste estudo, procurou-se verificar a ação das duas marcas comerciais de MTA (MTA-Ângelus[®] e ProRoot[®]) sobre a atividade de macrófagos M1 e M2 murinos eliciados peritonealmente em camundongos: C57BL/6 (M1) e C57BL/6 IL-12p40^{-/-} (M2). Para tanto, foram verificados a viabilidade, a aderência e o processo de fagocitose celular; a produção das citocinas: fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-12, IL-10 e produção de: radicais livres de oxigênio (ROIs) e óxido nítrico (NO).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inflamação e resposta imune

A palavra inflamação vem do latim *inflamare*; flogose, do grego *phlogos*: ambas significam pegar fogo. Fisiologicamente, é uma resposta do corpo frente a uma lesão, invasão por fatores externos e ocasionalmente, a uma auto-agressão (Trowbridge & EmLing, 1996). É uma reação dos tecidos conjuntivos vascularizados, caracterizada morfológicamente pela saída de líquido e de células do sangue para o interstício. O elemento morfológico essencial da inflamação é o exsudato celular (Pereira & Bogliolo, 1998).

Os processos inflamatórios aparecem após a ação dos mais diferentes agentes agressores físicos, químicos ou biológicos: é um fenômeno dinâmico, razão pela qual seu aspecto morfológico se modifica com o tempo (Pereira & Bogliolo, 1998).

A inflamação se caracteriza por três sinais básicos, descritos por Celsius, no primeiro século D.C.: calor, rubor, tumor, além da sintomatologia dolorosa. Só mais tarde, no século passado, deu-se importância às alterações funcionais que quase sempre acompanham uma reação inflamatória. Lewis, em 1927, sugeriu que modificações vasculares ocorriam durante a inflamação, resultado da liberação de uma substância vasodilatadora, a histamina. Ele observou que, após a injeção de histamina na pele, produziavam-se algumas características vasculares da resposta inflamatória aguda: rubor, edema e o extravasamento de proteínas dos capilares. Hoje, sabemos que o extravasamento de plasma dos vasos, um fato crucial na inflamação, não é necessariamente um processo danoso, mas desempenha um papel ativo nos mecanismos

defensivos. O plasma pode: carregar anticorpos; proporcionar fatores plasmáticos que promovem a movimentação de células sanguíneas para o sítio da lesão; e promover drenagem das áreas danificadas pela estimulação do sistema linfático. O edema, além de causar dor, quando ocorre descontroladamente, pode levar a célula a perder sua função e até a morrer (Gallin, 1993). A maioria das inflamações agudas e crônicas se desenvolvem e se amplificam como resultado do recrutamento de componentes humorais e celulares (Gallin, 1993).

A reação a substâncias estranhas, inclusive macromoléculas e polissacarídeos, é o que se denomina imunidade. Historicamente, imunidade significa proteção contra as doenças e, mais especificamente, as doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune, e sua resposta coordenada e coletiva à entrada de antígenos estranhos é a resposta imune. Porém, mecanismos que normalmente protegem os indivíduos de infecções e eliminam substâncias estranhas são capazes de causar lesão tecidual e doenças em algumas situações (Abbas *et al.*, 2000).

A defesa contra microorganismos é mediada, inicialmente, pela imunidade inata, seguida pela imunidade adquirida. A imunidade inata, também chamada de natural ou nativa, provê a primeira linha de defesa contra microorganismos. É a resposta rápida, imediata à entrada de um dado antígeno, e ocorre de forma semelhante para diferentes agentes infecciosos. Seus principais componentes são: as barreiras físicas e químicas; as células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos e células NK); as proteínas sanguíneas, incluindo o sistema complemento e outros mediadores da inflamação; as citocinas que regulam e coordenam muitas atividades das células da imunidade inata (Abbas *et al.*, 2000).

A imunidade adaptativa, chamada imunidade específica em função de sua capacidade de reconhecer diferentes microorganismos e macromoléculas, tem como componentes os linfócitos e seus produtos. A resposta adaptativa utiliza muitos mecanismos efetores da

imunidade inata para eliminar microorganismos. As características que definem essa resposta são: a especificidade, a diversidade, a memória, a especialização, a autolimitação e a tolerância (Abbas *et al.*, 2000).

Esse tipo de imunidade pode ser dividido em 2 subgrupos, de acordo com os componentes e a forma de eliminação dos microorganismos:

1 - Imunidade humoral – é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B; são especializados, e seus diferentes tipos podem ativar diferentes mecanismos efetores. Essa imunidade é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas (Abbas *et al.*, 2000).

2 - Imunidade celular – é mediada pelos linfócitos T. Tem como função promover a destruição dos microorganismos residentes nos fagócitos, ou a lise de células infectadas (Abbas *et al.*, 2000).

As principais células do sistema imune são os linfócitos, células acessórias e células efetoras. Os linfócitos são células que, especificamente, reconhecem e reagem aos antígenos estranhos; são, assim, os mediadores da imunidade humoral e celular. Os linfócitos podem apresentar-se sob dois subtipos distintos: os linfócitos B, que amadurecem na medula óssea, são as únicas células capazes de produzir anticorpos, e funcionam como mediadoras da imunidade humoral; os linfócitos T, que amadurecem no timo, e têm como função dar início à resposta imune, além de mediá-la e regulá-la. Tal população, por sua vez, é subdividida em: linfócitos T helper (Th) e os linfócitos T citotóxicos, que se diferenciam por apresentarem proteínas com membranas distintas. Essas células, por serem estimuladas por um antígeno, produzem e secretam citocinas que atuam em outras células, amplificando as respostas mediadas por elas, a produção do anticorpo pelos linfócitos B e medeiam, sob certas circunstâncias, as células T CD8⁺. A população de linfócitos Th pode ainda ser dividida em linfócitos Th1 e Th2, que possuem um

antagonismo funcional devido às diferentes citocinas produzidas pelos dois grupos (Abbas *et al.*, 2000). Os subgrupos Th1 e Th2 provêm do mesmo precursor, o linfócito T CD4⁺, e sua diferenciação é determinada pelo estímulo presente durante as respostas imunes iniciais. O estímulo mais importante de indução à diferenciação são as citocinas, com IL-12, principal indutor de células Th1 e IL-4 de células Th2 (Abbas *et al.*, 2000).

Os linfócitos Th1 produzem IL-2, IFN- γ , TNF- β , desencadeando a estimulação de mecanismos efetores celulares. A resposta mediada por células Th1 relaciona-se com as reações mediadas por células com a ativação de funções citotóxicas e hipersensibilidade do tipo retardado, além de estimular a troca de classe de IG para IgG2a e IgG2b em camundongos, e IgG1 e IgG3 em humanos. A resposta desencadeada por linfócitos Th2 caracteriza-se pela estimulação da produção de anticorpos dos subtipos IgG1 e IgG3 em camundongos e IgG2 e IgG4 no homem e, em particular, da IgE, pela eosinofilia e aumento da função de eosinófilos. Ela tem, portanto, um papel nas respostas alérgicas e infecção por helmintos. Células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Entretanto, ambas as populações de linfócito Th compartilham algumas citocinas, como a IL-3, TNF- α , o GM-CSF, encefalinas e quimiocinas (Abbas *et al.*, 2000).

A eliminação de um microorganismo, graças à imunidade adquirida, se processa por uma série de passos inter-relacionados. Primeiro, o antígeno é reconhecido como “estranho” por mecanismos específicos envolvendo os anticorpos ou por receptores dos linfócitos T, que se ligam aos epitopos (Gallin, 1993). Os linfócitos B expressam as moléculas de anticorpo em suas superfícies, que podem se ligar diretamente a proteínas, polissacarídeos ou lípidos estranhos. Os linfócitos T expressam receptores que reconhecem apenas seqüências curtas de peptídeos dos antígenos protéicos, que estejam presentes nas superfícies de outras células do organismo,

denominadas células apresentadoras de antígenos (APC), como, por exemplo, os macrófagos (Abbas *et al.*, 2000). A ligação de um componente de reconhecimento do sistema imune a um antígeno, geralmente, leva à ativação de um sistema de amplificação, envolvendo: a cascata do complemento, as citocinas, a cascata de coagulação, mediadores lipídicos e aminas produzidas pelos mastócitos. Esses mediadores alteram o fluxo sanguíneo, aumentam a permeabilidade vascular, aumentam a aderência dos leucócitos circulantes no endotélio vascular, promovem a migração dos leucócitos para os tecidos, e estimulam os leucócitos a destruir o agente estranho (Gallin, 1993). A destruição dos antígenos é mediada por células efetoras (linfóides ou não) e por mecanismos de defesa também operantes na imunidade natural. Particularmente, nesse momento, a interação entre a imunidade natural e a adquirida se torna mais evidente. Os anticorpos também ativam o sistema de complemento, que participa da lise e fagocitose de microorganismos. Os linfócitos T ativados secretam citocinas, que potencializam as funções dos fagócitos e estimulam as respostas inflamatórias. Os fagócitos, o complemento, os mastócitos, as citocinas, e os demais leucócitos que medeiam a reação inflamatória são todos componentes da imunidade natural, porque não reconhecem especificamente ou distinguem os diferentes antígenos estranhos. Todos esses componentes envolvem-se na defesa contra microorganismos, mesmo sem resposta imune específica (Abbas *et al.*, 2000).

2.2 Citocinas

As citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa e medeiam muitas das funções dessas células. São produzidas em resposta a microorganismos e

outros antígenos. Diferentes citocinas estimulam diversas respostas das células envolvidas na imunidade e na inflamação. Na fase ativa da resposta imune, citocinas estimulam o crescimento e diferenciação dos linfócitos, e nas fases efectoras da imunidade inata e adaptativa, elas ativam diferentes células para eliminar microorganismos e outros antígenos (Abbas, *et al.* 2000; Siqueira Júnior, 2000). Sua secreção é um evento breve e autolimitado, iniciada por uma nova transcrição do gene responsável por ela, graças à ativação celular (Abbas, *et al.* 2000; Júnior Siqueira, 2000).

As citocinas são produzidas por diferentes tipos celulares, e atuam sobre vários deles (pleomorfismo). São frequentemente redundantes e influenciam na síntese e ação de outras citocinas (Abbas *et al.*, 2000). Sua atuação inicia-se nos receptores específicos da superfície das células alvo (Abbas, *et al.*, 2000); agem por mecanismo autócrino, parácrino e, às vezes, endócrino (Pereira, *et al.* 1994).

Sinais externos regulam a expressão de receptores de citocinas e a resposta das células a essas substâncias (Abbas, *et al.*, 2000).

A resposta celular, mediada por muitas citocinas, consiste em induzir mudanças na expressão gênica das células alvo, que resultam na expressão de novas funções e às vezes, na proliferação dessas células (Abbas *et al.*, 2000). Dessa forma, as citocinas, em grande parte, medeiam as fases efectoras das imunidades natural e específica. Na imunidade natural, as citocinas efectoras são produzidas, principalmente, por fagócitos mononucleares, sendo também chamadas de monocinas. Na imunidade específica, são produzidas por linfócitos T ativados e chamadas de linfocinas. Em função de muitas citocinas serem produzidas por leucócitos e atuarem em outros leucócitos, elas são também chamadas de interleucinas (IL) (Abbas *et al.*, 2000).

Destacaremos, a seguir, as citocinas de interesse para nosso trabalho: o TNF, a IL-12 e a IL-10. Em função destas, estarem envolvidas no início do processo de resposta (TNF), nos processos de interligação da resposta imune inata a resposta imune adaptativa (IL-12) e na

regulação imuno-modulatória (IL-10). Além do fato do TNF ser um fator de ativação osteoclástica e a IL-12 e IL-10 serem citocinas de polarização macrofágica.

2.2.1 Fator de necrose tumoral (TNF)

O fator de necrose tumoral (TNF) é representado por duas proteínas homólogas, primariamente derivadas de fagócitos mononucleares (TNF- α) e linfócitos (TNF- β) (Siqueira Júnior, 2000; Borish *et al.*, 2003). A forma ativa de ambas as citocinas é um homotrímero (Borish *et al.*, 2003). O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e a outros microorganismos infecciosos, e é responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves. Foi originalmente identificado como uma substância presente no soro de animais tratados com LPS bacteriano (endotoxina), que causa necrose de tumor, *in vivo* (Abbas *et al.*, 2000).

A principal fonte celular de TNF- α são os fagócitos mononucleares ativados, apesar das células T estimuladas por antígenos, células natural killer, mastócitos e células endoteliais também secretarem essa proteína (Abbas *et al.*, 2000; Borish *et al.*, 2003). O estímulo mais potente para desencadear a produção de TNF por macrófagos é o LPS. Dessa forma, grandes quantidades dessas citocinas podem ser produzidas em infecções por bactérias gram-negativas. O Interferon- γ (IFN- γ), produzido por células T e células natural killer, aumenta a síntese de TNF por macrófagos estimulados por LPS (Abbas *et al.*, 2000).

Existem dois tipos diferentes de receptores de TNF: o de peso molecular de 55kD (denominado receptor de TNF tipo I – TNF-RI ou receptor p55) e o de peso molecular de 75kD

(chamado receptor de TNF tipo II – TNF-RII, ou receptor p75). Ambos os receptores de TNF estão presentes em quase todos os tipos celulares já examinados. Os receptores de TNF são membros da grande família TNF, e muitas dessas proteínas envolvem-se nas respostas imunes e inflamatórias (Abbas *et al.*, 2000).

A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento dos neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção e ativar essas células para erradicar os microorganismos. O TNF medeia esses efeitos através de várias ações:

1. Induz as células do endotélio vascular a expressarem novas moléculas de adesão, tornando a superfície do endotélio adesiva para leucócitos (inicialmente para os neutrófilos, e depois, para monócitos e linfócitos);
2. Estimula as células do endotélio e macrófagos a secretar quimiocinas, que induzem a quimiotaxia e o recrutamento leucocitário;
3. Induz a apoptose de muitos tipos celulares (Abbas *et al.*, 2000; Borish *et al.*, 2003).

Em infecções graves, o TNF é produzido em grandes quantidades e causa anormalidades sistêmicas, clínicas e patológicas. As principais ações sistêmicas do TNF são:

1. Atuar no hipotálamo induzindo a febre. A indução de febre, em resposta ao TNF, é mediada pelo aumento na síntese de prostaglandinas por células do hipotálamo, estimuladas por citocinas;
2. Atuar nos hepatócitos para aumentar a síntese de certas proteínas do soro;
3. Causar alterações no metabolismo sistêmico, que levam à caquexia, quando em produção prolongada;
4. Induzir a inibição da contratilidade miocárdica e do tônus da musculatura lisa vascular, provocando uma acentuada diminuição da pressão sanguínea, ou do choque;

5. Causar trombose intravascular, principalmente como resultado da perda das propriedades anticoagulantes normais do endotélio.

6. Causar graves distúrbios metabólicos, como baixa nas concentrações de glicose do sangue a níveis incompatíveis com a vida (Abbas *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2002).

2.2.2 Interleucina-12

A interleucina-12 (IL-12) é uma importante citocina que interliga a resposta imune inata à adaptativa, uma vez que direciona a diferenciação do subtipo de células T; é produzida pela ativação de monócitos e células dendríticas (Rogge *et al.*, 1997).

A IL-12 é um heterodímero com massa aparente de 70 kDa, formada por duas cadeias glicosiladas, uma de 35kDa, (cadeia leve, também chamada p35 ou IL-12 α) e 40kDa (cadeia pesada, também chamada p40 ou IL-12 β) codificadas por genes separados e não relacionados. Ambas as unidades são requeridas para a atividade biológica da IL-12 (Yun *et al.* 2001). A proteína p35 possui homologia à IL-6 (Borish *et al.*, 2003), enquanto p40 é homóloga ao domínio extracelular de membros da família de receptores de citocinas hematopoiéticas (Merberg *et al.*, 1992).

A produção de IL-12 é mediada por mecanismos reguladores positivos e negativos. Os produtos de microorganismos, incluindo bactérias, parasitas intracelulares, fungos, fita dupla de RNA são potentes indutores da produção de IL-12 por macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas (Ma *et al.*, 1997). Entretanto, particularmente para os fagócitos, os ligantes de receptores do tipo toll, sozinhos, não são suficientes para induzir a produção do heterodímero IL-

12; induz, geralmente, a expressão de apenas baixos níveis de p40; várias citocinas, como o IFN- γ e a IL-4, podem aumentar a habilidade das células produzirem IL-12 (Hayes *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1996).

A regulação negativa da IL-12 é mediada pela IL-10, que é um fator crucial para a manutenção do equilíbrio entre a resistência efetiva contra patógenos e a inflamação sistêmica, pelo bloqueio da transcrição de ambos os genes decodificadores, induzindo a síntese de proteínas ainda não identificadas (Aste-Amezaga *et al.*, 1998; D' Andrea *et al.*, 1993).

A IL-12 tem um papel fundamental nos processos imunes, por iniciar a seqüência de respostas envolvendo macrófagos, células natural killer, e linfócitos T, que culminará na erradicação dos microorganismos intracelulares. Assim, suas ações biológicas são:

1. Estimulação da produção de IFN- γ , pelas células natural killer e linfócitos T: os macrófagos e células dendríticas produzem IL-12, em resposta a muitos microorganismos; a IL-12, secretada, estimula as células natural killer e células T a produzir IFN- γ , que, então, ativa os macrófagos para eliminar os microorganismos fagocitados. Grandes quantidades de IL-12 são produzidas na sepse grave por gram-negativos, resultando na produção de IFN- γ , que age sinergicamente com o LPS estimulando os macrófagos a produzirem TNF;

2. Estimulação da diferenciação dos linfócitos T helper CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ ;

3. Aumento da função citolítica das células natural killer ativadas e linfócitos T citolíticos CD8⁺ (Abbas *et al.*, 2000).

2.2.2.1 Camundongos IL-12 knockout (IL-12p40^{-/-})

Camundongos knockout são camundongos mutantes, deficientes em um gene específico de interesse (Mak *et al.*, 2001).

Camundongos knockout para IL-12 apresentam uma resposta inadequada da imunidade celular (Magran *et al.*, 1996; Abbas *et al.*, 2000), além de aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas nas quais a proteção primária é mediada por IFN- γ , como nas leishmanioses (Mattner *et al.*, 1996) e na tuberculose (Cooper *et al.*, 1997). A resposta imune do tipo 1 (Th1) nesses animais é deficiente. Dessa forma, acredita-se que os macrófagos desses camundongos possuem um perfil M2 (Bastos *et al.*, 2002). Os dois tipos serão descritos no subitem sobre macrófagos desta revisão de literatura.

2.2.3 Interleucina-10

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos (Moore *et al.*, 1993; Mosmann *et al.*, 1994). Ela foi originalmente identificada pela sua habilidade em antagonizar a imunidade celular (De Waal *et al.*, 1991). Entre as suas características, destaca-se a potente qualidade imunossupressora: deprime a ativação de células mononucleares prevenindo a produção de mediadores da inflamação (DeWaal *et al.*,

1991; Fiorentino *et al.*, 1991); deprime a apresentação de antígenos (De Waal *et al.*, 1991); e a expressão de moléculas coestimuladoras, *in vitro* (Willems *et al.*, 1994).

Sua estrutura é representada por quatro domínios α -hélice globular que se ligam a receptores de citocinas tipo II (Abbas *et al.*, 2000).

O efeito biológico da IL-10 deve-se à sua habilidade de inibir muitas das funções dos macrófagos ativados. Ela atua no processo de inibição da resposta macrofágica frente a um estímulo, causando uma homeostase celular.

2.3 Fagócitos

São células ativamente envolvidas nos mecanismos defensivos do organismo, e altamente especializadas na fagocitose, na digestão intracelular e na capacidade de matar microorganismos e células. Dividem-se em 2 grupos: A – Fagócitos polimorfonucleares (por terem núcleo segmentado), representados por neutrófilos e eosinófilos. Ambos se originam da medula óssea a partir de mieloblastos e são encontrados circulando no sangue, aderidos à parede vascular ou migrando para os tecidos; B – Fagócitos mononucleares ou macrófagos, originados de monócitos circulantes, que, por sua vez, se derivam de monoblastos da medula óssea. Quando migram para os tecidos, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos, fixos ou livres, que recebem nomes diferentes conforme sua localização (Pereira *et al.*, 1994).

2.4 Macrófagos

O sistema fagocitário mononuclear compreende um conjunto de macrófagos: livres (circulantes, nos tecidos linfáticos e mieloide e nas cavidades naturais) e os fixos nos tecidos. Ambos constituem populações bastante heterogêneas, mas com propriedades comuns que permitem sua distinção. São células de núcleo reniforme, com centríolo localizado centralmente na célula (na reentrância do núcleo), de onde irradiam microtúbulos até a periferia; aí entram em contato com os microfilamentos da periferia do citoplasma; possuem numerosos lisossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático granular bem desenvolvido. Fagocitam intensamente, sobretudo ligando-se à porção para Fc de anticorpos, aos componentes do complemento e aos carboidratos encontrados na superfície de microrganismos (Pereira *et al.*, 1994).

As diferentes populações de macrófagos estão sujeitas a variações fenotípicas induzidas por sinais externos. Por essa razão, na mesma população podem-se ter macrófagos não ativados e macrófagos ativados. Quando estimulados, os macrófagos deixam a circulação, guiados por um fator quimiotático, e se acumulam num local (Abbas *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002).

Os macrófagos ativados mudam suas características: aumentam o próprio tamanho, seu número de grânulos, quantidade de retículo granular, capacidade de espriar, de aderir ao vidro, de pinocitar, de digerir e de produzir óxido nítrico e radicais a partir do oxigênio. Essas modificações são muito bem evidenciadas, *in vitro*, mas, muitas delas são observadas, também, *in vivo*. A principal característica do macrófago ativado é o aumento da sua atividade microbicida e tumoricida (Pereira *et al.*, 1994; Mosser, 2003).

Nos macrófagos ativados há aumento de receptores para Fc de IgG e para C3b. Algumas enzimas presentes na membrana reduzem sua atividade, outras a aumentam. Elas aumentam muito, também, a produção de superóxido. Secretam e excretam o ativador do plasminogênio, colagenase e elastase, além de possuírem numerosos outros fatores que interferem na atividade de outras células (Pereira *et al.*, 1994).

A ativação consiste em alterações quantitativas na expressão de determinados produtos de genes, que permitem à célula executar funções adicionais. As citocinas que promovem a ativação dos macrófagos são: IFN- γ , GM-CSF, IL-1, TNF (Abbas *et al.*, 2000). As citocinas, como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, têm a capacidade de inibir a ativação de macrófagos. A indução da ativação do macrófago é imunologicamente específica, enquanto sua expressão é inespecífica e consiste, em essência, numa capacidade antimicrobiana maior (Stites *et al.*, 1992).

Os fagócitos mononucleares são de fundamental importância na imunidade natural. Suas funções incluem:

- 1) Os macrófagos fagocitam partículas estranhas, como os microorganismos, macromoléculas, inclusive antígenos e até tecidos próprios que estejam lesados ou mortos. O reconhecimento que os macrófagos fazem das substâncias estranhas e tecidos lesados pode envolver receptores para fosfolípidos e açúcares. As substâncias fagocitadas são degradadas no interior dos macrófagos por enzimas lisossômicas. Os macrófagos funcionam como as principais células de defesa do corpo. Ademais, essas células secretam enzimas, espécies de oxigênio reativo, óxido nítrico e mediadores derivados de lípidos. Esses produtos são utilizados para matar microorganismos e controlar a propagação de infecções, mas também podem lesar tecidos normais nas proximidades do sítio inflamatório (Abbas *et al.*, 2000).

2) Os macrófagos produzem citocinas que recrutam outras células inflamatórias, especialmente neutrófilos e monócitos, ativam as células NK e são responsáveis por muitos dos efeitos sistêmicos da inflamação, como a febre. Também produzem fatores de crescimento para fibroblastos e células do endotélio vascular, promovendo o reparo dos tecidos (Abbas *et al.*, 2000).

Os fagócitos mononucleares funcionam também como células acessórias e efetoras nas repostas imunes. Desempenham os seguintes papéis, importantes nas fases cognitivas, de ativação e efetora da imunidade específica:

1) Os macrófagos apresentam antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II aos linfócitos T, por isso são denominados células apresentadoras de antígeno (APC). Dessa forma, os macrófagos funcionam como células acessórias da ativação linfocitária (Abbas *et al.*, 2000).

2) Na fase efetora de certas respostas imunes, as células T, estimuladas por antígeno, secretam citocinas (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α), que ativam os macrófagos. Tais macrófagos ativados são mais eficientes em realizar funções fagocitárias, degradativas e citolíticas que as células não estimuladas, e são, portanto, mais capazes de destruir os antígenos fagocitados. Assim, os macrófagos estão entre as principais células efetoras da imunidade celular (Abbas *et al.*, 2000).

3) Na fase efetora das respostas imunes humorais, antígenos estranhos são revestidos ou opsonizados por moléculas de anticorpos e proteínas do complemento. Como os macrófagos expressam receptores de superfície para anticorpos e para certas proteínas do complemento, eles se ligam às partículas opsonizadas e as fagocitam muito mais avidamente que as partículas não

revestidas. Assim, os macrófagos participam da eliminação de antígenos estranhos por respostas imunes humorais (Abbas *et al.*, 2000).

Os macrófagos estão distribuídos por todo o corpo; são mais numerosos em alguns órgãos, como fígado, baço e linfonodos. Os macrófagos fagocitam, do sangue ou da linfa, partículas e macromoléculas, funcionando como verdadeiros filtros clareadores. São também abundantes nos septos alveolares, nas serosas e na lâmina própria das mucosas. Existem ainda na epiderme e no tecido nervoso (Pereira *et al.*, 1994).

Os macrófagos estão presentes também no líquido sinovial e no colostro. No tecido ósseo, os osteoclastos representam o sistema fagocitário mononuclear. Eles resultam da fusão de macrófagos vindos da circulação, e desempenham papel fundamental na reabsorção óssea (Pereira *et al.*, 1994).

Recentes estudos evidenciaram que os macrófagos podem ser divididos em 2 tipos: M1 e M2, de acordo com sua habilidade em produzir diferentes tipos de resposta (Bastos *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2002; Mosser, 2003). A polarização M1/M2 é diferenciada pelos níveis constitutivos de IL-12 (Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003). Os macrófagos de perfil M1 são aqueles ativados pela forma clássica, como já descrito, na presença da IL-12. Em função disso, esses macrófagos aumentam sua produção de óxido nítrico e radicais reativos de oxigênio, na tentativa de eliminar os microorganismos (Mosser, 2003).

Os macrófagos de perfil M2 foram inicialmente identificados durante o exame de células em que a transcrição de IL-12 foi abolida. Para serem ativados, eles precisam de dois sinais: a ligação com o receptor FcγRs e a ligação com o receptor do tipo toll ou CD40 ou CD44 (Millis *et al.*, 2000). Dessa forma, eles promovem a conversão da arginase em ornitina, apresentando como produto final o colágeno e proliferação celular (Millis *et al.*, 2000; Bastos *et*

al., 2002; Mosser, 2003). Os macrófagos até produzem pequenas quantidades de NO e ROIs, porém, as altas concentrações de IL-10 e TGF- β inibem as células da vizinhança na sintetização de altos níveis desse componente. Com exceção de IL-10, IL-12, a produção das demais citocinas ocorre de forma semelhante a das citocinas produzidas pelos macrófagos de perfil M1. O nome, macrófagos ativados tipo II, deriva de sua habilidade em, preferencialmente, induzir resposta imune adaptativa tipo 2 (Mosser, 2003).

2.5 Fagocitose

A fagocitose é um processo de ingestão de matéria particulada, que envolve a aderência da membrana superficial ao corpo estranho, havendo, em seguida, o envolvimento completo da membrana em torno desse corpo. A eficiência do processo aumenta sensivelmente, se a membrana da célula fagocitária puder aderir com especificidade ao objeto que irá sofrer a fagocitose. Tanto os fagócitos mononucleares quanto os neutrófilos expressam receptores para as porções Fc das moléculas de IgG. Por meio desses receptores, quando as moléculas de IgG opsonizam as partículas antigênicas, ocorre um aumento da eficiência da fagocitose. Os receptores de mais elevada afinidade são os mais importantes para a fagocitose, e os subtipos de IgG que se ligam melhor a esses receptores são os mais eficientes nesse processo. (Abbas *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002).

A fixação de uma célula a uma partícula pequena resulta na formação de um local de ligação de pseudópodes, que envolve a partícula e, por fim, funde-se no seu pólo distal. A

superfície celular do fagócito envolve completamente a partícula engolfada, formando uma vesícula fagocítica ou fagossoma, que se move dentro da célula e se funde com os grânulos citoplasmáticos. Isso estabelece um ambiente local, em que a oportunidade para a degradação da partícula pelas enzimas dos grânulos citoplasmáticos no fagossoma é intensificada. A fagocitose requer energia metabólica e um sistema citoplasmático ativo de proteínas contráteis. É estimulada pela presença de C3b e anticorpos do tipo IgG, que têm papéis separados, mas sinérgicos nesse processo (Stites *et al.*, 1992).

Essa ligação induz uma série de eventos intracelulares, com conseqüente influxo de íons Ca^{+2} , que ativam filamentos contráteis, como os de actina e miosina que passam a circular na região próxima ao microorganismo endocitado. A contração desses filamentos tende a empurrar o microorganismo em direção ao interior da célula (Siqueira Júnior, 2000).

Após a internalização, o microorganismo pode ser destruído por quatro mecanismos básicos: pelo pH ácido presente no interior do fagossoma; pela ação do conteúdo dos grânulos; por radicais livres derivados do oxigênio; por radicais livres derivados do nitrogênio (Siqueira Júnior, 2000). A queda do pH ocorre devido à glicólise, que gera o acúmulo de ácido láctico. Contudo, essa queda de pH, muitas vezes, não é de magnitude suficiente para destruir o microorganismo fagocitado (Siqueira Júnior, 2000). A fusão de grânulos citoplasmáticos ao fagossoma leva à formação de um fagolisossoma, e o conteúdo das organelas citoplasmáticas é descarregado dentro do vacúolo fagocítico. A eliminação de microorganismos, pela ação do conteúdo dos grânulos presentes no fagossoma, assume um papel especialmente importante em um ambiente onde a tensão de oxigênio é baixa, o que reduz a geração de radicais oxigenados (Siqueira Júnior, 2000).

A produção dos radicais reativos de oxigênio e de óxido nítrico, como mecanismos de eliminação dos microorganismos fagocitados, será descrita nos itens seguintes.

As células fagocíticas podem liberar enzimas lisossomais e radicais livres para o espaço extracelular. A exocitose desses elementos contribui para a defesa do hospedeiro, levando à destruição de microorganismos de difícil fagocitose, que incluem: microorganismos muito grandes; microorganismos que formam colônias volumosas e coesas; e microorganismos aderidos a superfícies sólidas (Siqueira Júnior, 2000). Todavia, a liberação desses fatores também é responsável pelo dano tecidual associado aos processos inflamatórios. Enzimas lisossomais e radicais oxigenados são os principais responsáveis pela degradação da matriz extracelular e de outros componentes teciduais, ocasionando a formação do pus (Abbas *et al.*, 2000; Siqueira Júnior, 2000).

2.6 Radicais livres de oxigênio (ROIs)

Um dos mecanismos de eliminação de microorganismos fagocitados é a produção de radicais livres de oxigênio (ROIs). Esses radicais são representados pelo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) (Babior *et al.*, 2002; Carlos *et al.*, 2003). Os radicais livres de oxigênio apresentam alta capacidade de atuar como agentes oxidantes que destroem microorganismos (e outras células) além de serem oriundos da conversão catalítica da molécula de oxigênio. O sistema primário gerador de radicais livres é o sistema da fagócito oxidase, que é uma enzima encontrada em fagócitos ativados, na membrana plasmática. Sua função é reduzir moléculas de oxigênio em radicais intermediários de oxigênio (ROIs), assim como radicais superóxidos, utilizando a coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como doador de elétron. O ânion superóxido pode ser convertido em peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase. O processo pelo qual os ROIs são produzidos é denominado explosão respiratória. Esse processo é iniciado após aproximadamente 1 minuto de sua exposição ao estímulo (Carlos *et al.*, 2003). O TNF e o LPS, assim como alguns peptídeos bacterianos e quimiocinas podem sensibilizar neutrófilos e macrófagos a produzir grande quantidade de ROIs (Abbas *et al.*, 2000).

Quando neutrófilos e macrófagos são ativados, eles podem lesar o tecido normal do hospedeiro pela liberação de ROIs, óxido nítrico, e enzimas lisossomais. Os produtos microbianos dessas células não distinguem entre o tecido do hospedeiro e os microorganismos. Como resultado, se esses produtos são liberados no tecido extracelular, eles são capazes de causar dano tecidual (Abbas, A. K. *et al.*, 2000). Os radicais livres de oxigênio podem danificar células endoteliais, promovendo aumento da permeabilidade vascular. Eles podem inativar antiproteases, como a α 1-antitripsina, por oxidação do resíduo metionil da antiprotease. Isso inibe um dos melhores mecanismos reguladores da destruição tecidual, permitindo o papel devastador das proteases endógenas ou bacterianas sobre os componentes estruturais dos tecidos. Eles também são citotóxicos para uma gama variada de células endoteliais, fibroblastos, leucócitos, plaquetas, espermatozóides, entre outros. A citotoxicidade parece estar relacionada a efeitos diretos sobre fosfolipídios da membrana citoplasmática, proteínas e DNA. Os radicais livres induzem a peroxidação lipídica por reagirem com ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios da membrana, gerando peróxidos, que iniciam uma reação autocatalítica que resulta na perda dos ácidos graxos insaturados, com conseqüente dano extenso à membrana citoplasmática. A oxidação de proteínas, principalmente de enzimas contendo grupamentos sulfidrílica, pode torná-las inativas. Por fim, radicais podem interagir com o DNA, causando danos irreversíveis à molécula (Siqueira Júnior *et al.*, 2000).

Existem mecanismos antioxidantes presentes no soro, fluidos teciduais e células que tendem a regular ou neutralizar os efeitos dos radicais livres de oxigênio. São eles: superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ceruloplasmina, transferrina e glutathione peroxidase (Siqueira Júnior *et al.*, 2000).

Em locais de necrose, onde há comprometimento do fluxo sangüíneo, a geração de radicais oxigenados é prejudicada, pela baixa disponibilidade de oxigênio (Siqueira Júnior *et al.*, 2000).

A produção de ROIs é influenciada pelo fenótipo dos macrófagos. Como já foi descrito anteriormente, os macrófagos do tipo M1 promovem, quando ativados, um aumento na produção de ROIs enquanto os macrófagos do tipo M2, ao contrário, promovem a conversão da arginase em ornitina (Millis *et al.*, 2000), levando à produção de colágeno e proliferação celular.

2.7 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é composto por um único átomo de nitrogênio e um de oxigênio. O óxido nítrico reage em água com oxigênio e produz outros radicais, ânions moderadamente estáveis (NO_2^-), ânions muito estáveis (NO_3^-), óxidos não estáveis (N_2O_3) e peróxidos não estáveis (ONOO^-). A maioria dessas formas são produzidas poucos segundos após a enzima óxido nítrico sintase (NOS) iniciar sua atividade. Essa enzima catalisa a oxidação da amina do grupo guanidina da arginina em óxido nítrico. O outro produto da reação é a citrulina, sendo que o NADPH e O_2 são necessários para a síntese de óxido nítrico (Macmicking *et al.*, 1997). A óxido nítrico sintase tem três isoformas; a de importância imunológica é conhecida

como óxido nítrico sintase indutível (iNOS) ou do tipo dois (Macmicking *et al.*, 1997; Siqueira Júnior, 2000; Brennan *et al.*, 2003).

A NOS1 foi a primeira das enzimas óxido nítrico sintase a ser purificada e clonada a partir de tecidos neurais e se denomina nNOS. Esse tipo de NOS é constitutiva; é cálcio-dependente e produz NO em baixas concentrações. Os neurônios possuem essa enzima e produzem NO constitutivamente. Os níveis de NO-sintase podem aumentar após a estimulação por citocinas (Macmicking *et al.*, 1997; Siqueira Júnior, 2000; Brennan *et al.*, 2003). A NOS2 ou iNOS é uma enzima induzida após a ativação de macrófagos por citocinas, como TNF- α , IFN- γ (Siqueira Júnior, 2000), IL-1 e pelo LPS (Brennan *et al.*, 2003). Uma vez expressa, a iNOS induz a síntese de NO por períodos de tempo prolongados, em maior quantidade. É considerada como um segundo sistema gerador de radicais livres em adição ao sistema fagócito oxidase visto nos ROIs. Essa forma de NOS é independente dos íons cálcio e pode ter sua produção inibida por corticosteróides (Siqueira Júnior, 2000), pelo próprio NO, como também, por TGF- β , IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10 (Brennan *et al.*, 2003). A NOS3 foi a primeira isoforma encontrada nas células endoteliais, também chamada de eNOS. À semelhança da NOS1, também é uma enzima constitutiva e expressa continuamente em baixas concentrações nas células endoteliais. É cálcio dependente e, juntamente com a NOS1, pode ser estimulada em algumas situações, como por exemplo, na gravidez (Macmicking *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 2003).

Na última década, demonstrou-se claramente que o NO produzido por macrófagos é um dos principais mediadores responsáveis pela atividade citotóxica contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais (Macmicking *et al.*, 1997).

O NO não é apenas citotóxico, mas pode também atuar como mensageiro intercelular. Células endoteliais produzem e liberam NO após a estimulação por citocinas ou acetilcolina. O

óxido nítrico liberado difunde-se para o músculo liso adjacente, induzindo seu relaxamento e conseqüente vasodilatação. NO age pela ligação ao componente heme da enzima guanilato ciclase, que promove um aumento intracelular da GMPc. Esse nucleotídeo cíclico age como um sinal que induz o relaxamento da célula muscular. O óxido nítrico pode também inibir a agregação plaquetária, interferindo no processo de coagulação (Siqueira Júnior, 2000).

Em condições basais, baixos níveis de NO são liberados continuamente, promovendo, no endotélio vascular, uma vasodilatação que se opõe à vasoconstrição simpática (Kendall *et al.*, 2001).

Por ser uma molécula pequena e neutra, o NO pode facilmente atravessar membranas, agindo como destruidor celular ou como mensageiro intercelular. A sua alta reatividade contribui para sua labilidade, seus efeitos se restringem ao local de sua liberação e são rapidamente neutralizados, principalmente pelo oxigênio, cuja reação dá origem a dois produtos não-reativos: nitrito e nitrato (Júnior Siqueira, 2000).

A vida média do óxido nítrico é de poucos segundos. Sua ação parece se concentrar na reação com íons ferro, essenciais na divisão celular e em cadeias de transporte de elétrons. Além disso, NO pode se combinar com radicais de oxigênio, formando peroxinitrito, também tóxico para as células vivas (Macmicking *et al.*, 1997).

2.8 Resposta dos tecidos pulpaes à infecção bacteriana

A polpa dentária é um tecido conjuntivo que possui abundantes vasos sangüíneos e linfáticos, nervos mielínicos e amielínicos, e células mesenquimais indiferenciadas. Semelhante

aos outros tecidos conjuntivos do corpo, ela reage à infecção bacteriana ou a outros estímulos pela resposta inflamatória. Entretanto, certas características anatômicas desse tecido tendem a modificar a natureza e o curso dessa resposta. O fato de o tecido pulpar estar confinado entre paredes mineralizadas de dentina, inextensíveis, impede a tumefação excessiva do tecido, quando da formação do edema inflamatório. A circulação colateral encontra-se, nesses casos, comprometida nesse órgão, uma vez que, tanto a circulação sanguínea aferente quanto a eferente penetram e saem do dente, através de forames apicais minúsculos (Shafer *et al.*, 1983).

Uma polpa normal pode ser considerada imunocompetente, com a capacidade de responder a estímulos nocivos. Células apresentadoras de antígenos estão presentes na camada odontoblástica e ao longo dos vasos sanguíneos, além de células semelhantes a macrófagos serem encontradas na porção mais central da polpa (Bergenholtz *et al.*, 1991, Okiji *et al.*, 1992). Um pequeno número de células T recirculantes é identificado, com a predominância de linfócitos T CD8⁺, enquanto as células B são raras ou indetectáveis (Hahn *et al.*, 1989). Porém, os plasmócitos estão ausentes (Pulver *et al.*, 1977).

Diante de uma agressão microbiana, a extensão da destruição tecidual dependerá da sua virulência, bem como da resistência dos tecidos do hospedeiro. O grau de resposta pulpar aos irritantes bacterianos varia de uma inflamação tissular leve à necrose pulpar completa, podendo evoluir para uma osteomielite perirradicular aguda, com sinais e sintomas sistêmicos de infecção intensa (Kettering & Torabinejad, 1997).

A resposta inicial à exposição pulpar e invasão bacteriana e/ou difusão de seus subprodutos, pelos túbulos dentinários, inclui o influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (Warfvinge *et al.*, 1985) e monócitos (Bergenholtz *et al.*, 1991), caracterizando o infiltrado inflamatório agudo. Com a progressão da infecção, o infiltrado celular torna-se mais intenso, crônico, e assume um caráter típico misto, consistindo de células T-helper e T-citotóxico. As

Células B e plasmócitos também estão presentes como elementos específicos, junto com os PMNs, monócitos e células natural killer, como componentes não específicos (Pulver *et al.*, 1977; Hahn *et al.*, 1989). Os níveis de IgG e IgA são elevados (Speer *et al.*, 1977), sugerindo a possibilidade de proteção durante o processo de invasão bacteriana (Hahn e Falkler, 1992). Geralmente, esses mecanismos não são capazes de erradicar a infecção: a destruição tecidual, com a formação de pequenos abscessos e focos necróticos na polpa (Hahn *et al.*, 1989), irá ocorrer com eventual progressão para a necrose pulpar total, na qual o número de linfócitos decresce dramaticamente (Hahn *et al.*, 1989).

Instalada a necrose tecidual, o sistema de canais radiculares torna-se um ambiente favorável para a colonização por uma microbiota mista e anaeróbia que induzirá alteração inflamatória nos tecidos periodontais circunvizinhos aos forames apicais.

2.9 Resposta do tecido perirradicular à infecção bacteriana

Vários estudos demonstraram que o sistema de canais radiculares pode atuar como uma via para a sensibilização do hospedeiro (Kennedy *et al.*, 1957; Barnes & Langeland, 1966; Page *et al.*, 1973). Do mesmo modo que nas lesões pulpares humanas, as alterações patológicas associadas às lesões perirradiculares são mediadas por reações inflamatórias não específicas e/ou respostas imunes específicas (Torabinejad *et al.*, 1985). Assim, em muitos aspectos, a gênese da resposta inflamatória periapical recapitula a resposta inflamatória pulpar, exceto pela destruição óssea (Stashenko *et al.*, 1998).

O infiltrado inflamatório das lesões periapicais crônicas tem sido descrito em modelos humanos e não-humanos. Os trabalhos demonstram que à semelhança do que ocorre na polpa, nessa região irá instalar-se um infiltrado inflamatório constituído por linfócitos T e B, PMNs, macrófagos, plasmócitos (Stern *et al.*, 1981; Tani-Ishii *et al.*, 1995; Kawashima *et al.*, 1996), células NK, eosinófilos e mastócitos (Artese *et al.*, 1991; Kawashima *et al.*, 1996). Esse infiltrado constitui aproximadamente 50% das células presentes nos granulomas periapicais. Outras células do tecido conjuntivo não inflamatório, aí presentes, incluem os fibroblastos, endotélio vascular, epitélio proliferativo, osteoblastos e os osteoclastos (Yu & Stashenko, 1987). Existem divergências com relação à predominância do tipo celular inflamatório nas lesões periapicais. Alguns pesquisadores acreditam que sejam os linfócitos (Yu & Stashenko, 1987); outros, os macrófagos (Stern *et al.*, 1981; Kawashima *et al.*, 1996).

Tanto células T-helper ($CD4^+$) como T-citotóxicas ($CD8^+$) são identificadas nas lesões periapicais (Matsuo *et al.*, 1992). Kawashima *et al.* (1996), observaram que, entre o período de 14-28 dias, quando a lesão apresenta atividade de expansão, ocorre predominância dos linfócitos T $CD4^+$, enquanto, após o 56º dia, ocorre predominância dos linfócitos T $CD8^+$.

Pulver *et al.* (1978) foram os primeiros a demonstrar a produção celular de imunoglobulinas em lesões periapicais. As células IgG positivas são as mais proeminentes (70%), seguidas pelas IgA (14%), IgE (10%) e IgM (4%).

Todos os tipos celulares inflamatórios, que medeiam tanto a resposta inflamatória específica quanto a não-específica, infiltram-se na região pulpar e periapical em resposta à infecção. Essas células medeiam inteiramente o espectro da resposta imune, incluindo: ativação dos PMNs e dos macrófagos, hipersensibilidade do tipo retardada, reações citotóxicas, complexo imune e hipersensibilidade mediada por complemento, a resposta anafilática, assim como a

produção de citocinas por linfócitos, macrófagos e células do tecido conjuntivo do hospedeiro, metabólitos do ácido aracônico e cininas (Stashenko *et al.*, 1998).

Yu & Stashenko (1987), observando o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, sob avaliação histológica, constataram que a extensão da inflamação da polpa e do periápice necrosados eram evidentes após o 7º dia de exposição pulpar; que as lesões tornavam-se estáveis em tamanho entre os dias 15 e 30 e que apresentavam um aumento significativo no dia 90. Wang & Stashenko (1991) encontraram resultados semelhantes analisando a cinética de expansão de lesões por radiografias, como também, a cinética e a atividade de reabsorção óssea das lesões periapicais em ratos, 30 dias após a exposição pulpar.

Stashenko *et al.* (1998), relataram que a inflamação periapical não é fruto da ação direta de microorganismos, mas sim, de mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas. Propuseram que a cinética de desenvolvimento dessas lesões seria mais bem entendida no contexto dos dois principais subtipos de células T-helper, Th1 e Th2. As células Th1 medeiam reações de hipersensibilidade do tipo retardado, produzindo IFN- γ , IL-2, TNF- α e GM-CSF e são estimuladas a se diferenciarem, nesse subtipo de Th, quando na presença de IL-12. Em contrapartida, células Th2 promovem a proliferação e diferenciação das células B, em plasmócitos produtores de anticorpos. As citocinas produzidas por esses linfócitos Th2 são representadas pela IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Esses dois subtipos celulares possuem regulação cruzada, e suas citocinas são antagônicas, agindo para inibir a proliferação e produção de citocinas do subtipo oposto. Atualmente, o modelo mais aceito para o desenvolvimento das lesões perirradiculares está ligado ao subtipo Th1, que estimula a produção dos fatores de ativação osteoclástica (IL-1, TNF- α e IL-11) e outras citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, ativam os osteoclastos a iniciarem a reabsorção óssea. A inibição dessa resposta relaciona-se

às citocinas secretadas pelas células de subtipo Th2. As citocinas que exerceriam maior influência na produção de IL-1 e sua ativação incluem: IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-1; enquanto as citocinas que promoveriam sua supressão seriam: IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13.

2.10 Macrófagos nas lesões periapicais

Diversos estudos foram realizados em humanos e em animais a fim de observar a presença dos macrófagos nas lesões periapicais. Stern *et al.* (1981) observaram que, em lesões periapicais humanas, os macrófagos representam mais de 46% das células inflamatórias aí encontradas, seguidas pelos linfócitos, com 31,97%; plasmócitos, com 12,94%; e neutrófilos, com 8,11%. Com relação ao total geral de células, os macrófagos representam 24% desse total, seguidos pelos linfócitos, com 16%; plasmócitos, com 7%; neutrófilos, com 4%; fibroblastos, com 40%; elementos vasculares, com 6%; e células epiteliais com 5% do total celular. Outro fato importante observado pelos autores é que essa porcentagem não variou entre os pacientes com ou sem sintomatologia dolorosa, com ou sem tratamento endodôntico prévio, em lesões detectadas há mais ou menos um ano.

Em modelos de ratos, Akamine *et al.* (1994) acompanharam lesões periapicais por 150 dias e demonstraram que, nos 10 primeiros dias, o número de macrófagos aumenta, sendo mantido até o sexagésimo dia, quando, em seguida, declina gradualmente. Kawashima *et al.* (1996), constataram, pela imunohistoquímica, que, na exposição pulpar em dentes de camundongos, o influxo de macrófagos nos tecidos periapicais era mais evidente entre os dias 0 e

3 após a exposição, quando muitas polpas radiculares ainda permaneciam vitais. Tal fato indica que os tecidos periapicais são altamente responsivos ao dano pulpar e que essa resposta se inicia rapidamente como uma segunda linha da defesa local, preparando os tecidos perirradiculares para reagirem às agressões advindas do sistema de canal radicular.

Os macrófagos presentes no granuloma periapical, na resposta inata, contribuem como fagócitos, para prevenir a disseminação das bactérias do sistema de canal radicular infectado (Metzger, 2000). Na resposta antígeno-específica, atuam como células apresentadoras de antígenos (APC) nos passos iniciais da indução da imunidade adquirida. Nessa fase, os macrófagos produzem IL-1, que é essencial para a ativação dos linfócitos (Metzger, 2000).

Na regulação da destruição e reparo do tecido, os macrófagos estimulados, além de produzirem IL-12, para promover a diferenciação das células Th em células Th1 (Stashenko *et al.*, 1998), são a principal fonte de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , além de produzirem outras moléculas ativas, como as metalo-proteases (colagenase, elastase) e prostaglandinas. Alguns desses produtos danificam diretamente os constituintes do tecido conjuntivo, enquanto outros, como as citocinas, ativam os osteoclastos, a reabsorção óssea ou o reparo do tecido pela produção de colágeno (Metzger, 2000).

Apesar da alta quantidade de macrófagos presentes nas lesões periapicais, apenas alguns estão ativos e, dentre eles, apenas 2 e/ou 3% produzem IL-1 (Artese *et al.*, 1991).

2.11 MTA

O MTA é um pó, constituído de partículas hidrofílicas de silicato de tri-cálcio, aluminato tri-cálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato e outros óxidos minerais. Cálcio e fósforo são os principais íons nele presentes, e o óxido de bismuto lhe tem sido adicionado para torná-lo radiopaco. A hidratação do pó em água destilada resulta em um gel coloidal, que se solidifica em aproximadamente 3 horas (Lee *et al.*, 1993; Torabinejad *et al.*, 1995; Abedi & Ingle, 1995; Adamo *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1999).

Existem dois tipos de MTA disponíveis no mercado: o MTA cinza e o MTA branco. O MTA branco foi desenvolvido recentemente, em função do ocasional manchamento da coroa dental quando o MTA cinza era utilizado em pulpotomias e capeamentos pulpares. Segundo Torabinejad (1997) não existem diferenças entre esses dois tipos de MTA. Entretanto, Faraco Júnior (1999) observou, durante a manipulação dos cimentos, que o tempo de presa do MTA cinza é menor do que o do MTA branco. Holland *et al.* (2002) realizaram um trabalho, comparando os dois tipos de MTA, e concluíram que os mecanismos de ação do MTA branco e cinza são similares.

O MTA encontra-se disponível comercialmente com o nome ProRoot (Tulsa Dental[®]), sendo que, mais recentemente, foi lançado no mercado nacional o MTA-Ângelus (Odonto-lógika[®]).

O MTA é utilizado em aplicações cirúrgicas e não cirúrgicas. Tem sido um material com as melhores propriedades para aplicações clínicas endodônticas que envolvem reparos radiculares e formação óssea, quando comparado com outros materiais já conhecidos como: amálgama, IRM[®], ionômero de vidro, cimento de óxido de zinco e Super-EBA[®] (Lee *et al.*, 1993; Torabinejad *et al.*, 1993; Torabinejad *et al.*, 1994; Ford *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1995d, e; Abedi & Ingle, 1995; Torabinejad & Chivian, 1999).

Recentes estudos têm comparado o MTA com o cimento de Portland. Os resultados demonstraram que ambos possuem muitos componentes em comum. Alguns deles são: o fosfato de cálcio, óxido de cálcio e a sílica. Dos componentes do MTA, apenas o óxido de bismuto, que lhe confere radiopacidade, está ausente no cimento de Portland (Torabinejad *et al.*; 1995; Estrela *et al.*; 2000). O MTA e o cimento de Portland têm propriedades microscópicas, macroscópicas e análise da difração de raio X quase idênticas (Wucherpfenning *et al.*, 1999). Tem-se demonstrado que o cimento de Portland e o MTA possuem efeitos similares em células pulpares, quando utilizados em capeamento pulpar em ratos (Wucherpfenning *et al.*, 1999). Além disso, células semelhantes aos osteoblastos apresentam crescimento celular e formação de matriz similar, quando colocadas em meio contendo o MTA ou o cimento de Portland a seco (Wucherpfenning *et al.*, 1999). Tanto o MTA quanto o cimento de Portland induzem a formação de ponte de dentina, após a realização de pulpotomia em cachorros (Holland *et al.*, 2001). O MTA e o cimento de Portland formam granulações de cristal de calcita quando colocados em tubos de dentina implantados subcutaneamente em ratos, sugerindo que são materiais similares (Holland *et al.*, 2001). O MTA e o cimento de Portland também possuem atividade antibacteriana semelhantes (Estrela *et al.*, 2000).

2.11.1 Propriedades físico-química

O MTA apresenta satisfatórias propriedades físico-químicas. Porém, suas características dependem do número de partículas, proporção pó-água, temperatura, presença de água (Torabinejad *et al.*, 1995c). O pó do MTA deve ser misturado com água esterilizada na

proporção de 3:1. Não se conhecem os efeitos sobre suas propriedades físicas, químicas e biológicas, quando misturado com anestésico ou outros líquidos estéreis (Schwartz *et al.*, 1999). O excesso de umidade deve ser removido e, caso o campo fique muito seco, deve-se adicionar mais água à mistura (Torabinejad & Chivian, 1999). Na presença de umidade, o MTA sofre ligeira expansão, convertendo-se em um gel coloidal que se cristaliza e, posteriormente, expande-se, promovendo o selamento marginal das cavidades. Tal fato proporciona melhor habilidade seladora ao MTA, quando ele é comparado aos outros materiais, como o amálgama, IRM[®] e Super-EBA[®], submetidos a testes de infiltração de corantes e de bactérias (Torabinejad *et al.* 1995a; Torabinejad *et al.*, 1995d; Fischer *et al.*, 1998; Nakata *et al.*, 1998; Adamo *et al.*, 1999).

Seu pH inicial é de 10,2, e após 3 horas de manipulação é de 12,5, semelhante ao do hidróxido de cálcio, tornando-se constante em seguida (Torabinejad *et al.*, 1995c; Adamo *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1999; Torabinejad & Chivian, 1999). Porém, um estudo, *in vitro*, realizado por Duarte *et al.* (2003), utilizando o MTA-ProRoot, demonstrou valores de pH de 9,32, 9,07, 9,02 e 9,22 correspondendo aos tempos de 3, 24, 72 e 168 horas após sua manipulação. Enquanto, no grupo do MTA-Ângelus, os valores de pH encontrados foram de 9,52, 9,37, 9,32 e 9,30 para os mesmos tempos do ProRoot – Tulsa Dental. Esses resultados foram inferiores aos já relatados, provavelmente em função desse estudo utilizar as amostras inseridas em tubos, o que limita a superfície de contato com o meio ao redor. Mesmo com valores de pH diferentes dos de estudos prévios, esse demonstrou a ausência de diferença estatística entre o pH obtido com os dois materiais.

Duarte *et al.* (2003) avaliaram a liberação de íons cálcio pelo MTA das duas marcas comerciais (nacional e importada), nos mesmos tempos utilizados para se avaliar o pH. Os

resultados obtidos demonstraram altos níveis de íons cálcio, em todos os tempos analisados, e não se observou diferença estatística entre os materiais testados.

Com relação à radiopacidade, o MTA, quando utilizado como material retrobturador, apresenta um maior nível que o IRM[®], Super-EBA[®], a guta-percha e a dentina, fato facilmente evidenciado em radiografias (Torabinejad *et al.*, 1995c; Adamo *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1999).

Apresenta baixa solubilidade, e seu tempo de endurecimento é de aproximadamente 3 horas, maior que o observado para o IRM[®] e o Super-EBA[®]. Sua força de compressão é de 70 Mpa em 21 dias, sendo menor que a do amálgama e semelhante a do Super EBA[®]. Essa força de compressão é aumentada após 3 semanas de manipulação (Torabinejad *et al.*, 1995c; Torabinejad & Chivian, 1999). Em função dessa baixa resistência à compressão, o MTA não pode ser colocado em áreas funcionais (Abedi & Ingle, 1995; Adamo *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1999). Quando utilizado em retroobturações, essa força não é significativa, pois os materiais não recebem cargas oclusais (Torabinejad *et al.*, 1995).

2.11.2 Propriedades antimicrobianas

Investigando o efeito antimicrobiano de alguns cimentos retrobturadores, Torabinejad *et al.*(1995b) observaram que o MTA não apresentou tal efeito sobre os *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e nenhum efeito às bactérias anaeróbias estritas.

A atuação antibacteriana do amálgama, cimento de ZOE[®], Super-EBA[®] e MTA sobre 9 bactérias facultativas (*Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus species*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) e 7 bactérias anaeróbias (*Prevotella buccae*, *Bacterioides fragilis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogênica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium necrophorum*) foi avaliada por Torabinejad *et al.* (1995d). Os autores observaram que o MTA não apresentou ação antibacteriana sobre nenhum dos anaeróbios, mas causou algum efeito em 5 dos 9 facultativos. Seu valor antibacteriano está associado ao seu alto pH ou à liberação de substâncias difusíveis no meio de crescimento. O MTA, a fresco, teve maior efeito antimicrobiano que o MTA após a presa. Nenhum dos materiais teve qualquer efeito sobre bactérias anaeróbicas estritas após 48 horas.

Estrela *et al.* (2000), também objetivando verificar a ação antimicrobina do MTA, testaram três linhagens bacterianas de referência (ATCC): *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e ainda a levedura *Cândida albicans* e compararam os resultados obtidos com aqueles observados com uma pasta de hidróxido de cálcio (PHC), ao Sealapex[®], ao Dycal[®] e ao cimento Portland. De acordo com os resultados, a atividade antimicrobiana da PHC sobre todos os microorganismos testados foi superior aos demais. O MTA, o cimento Portland e o Sealapex[®] apresentaram somente zonas de difusão. Os resultados similares observados entre o MTA e o cimento de Portland se devem, provavelmente, à composição de ambos.

Tais estudos demonstram que o MTA não permite a infiltração bacteriana em ambientes altamente contaminados, principalmente, pela sua capacidade de selamento e não pelo seu poder antimicrobiano, conferido pelo alto pH.

2.11.3 Citotoxicidade

Vários estudos comprovam que, por ser um material biocompatível, o MTA não promove inflamação tecidual significativa. Adicionalmente, esse material permite o processo de reparo em diversas situações, induzindo a deposição de tecido dentinário, cementário e ósseo (Pitt Ford *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1995a, Pitt Ford *et al.*, 1996; Torabinejad *et al.*, 1997; Torabinejad *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999a, Shabahang *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2001a, Holland *et al.*, 2001b).

A reação tecidual ao MTA, após implantação óssea, demonstra melhores resultados quando comparados aos obtidos com Super-EBA (Torabinejad *et al.*, 1995f), amálgama e IRM (Torabinejad *et al.*, 1998), porém, com citotoxicidade similar à observada com o cimento de Portland (Saidon *et al.*, 2003). Essa reação tecidual ao MTA caracteriza-se por ausência ou pequena inflamação e neoformação óssea com presença de tecido duro adjacente ao MTA.

Torabinejad *et al.* (1997) e Torabinejad *et al.* (1995g), após tratamento endodôntico, utilizaram o MTA em cirurgias pararendodônticas e puderam observar que, na maioria das amostras, houve formação de uma camada de cimento e óssea, respectivamente, confirmando os resultados dos experimentos já citados.

Holland *et al.* (2002b) observaram que, em pulpotomias e proteção diretas sobre a polpa, utilizando-se o MTA e o cimento de Portland, foi possível notar a formação de dentina sob o material.

Existe pouca informação na literatura sobre o potencial mutagênico dos materiais de retrobturação. Ketterin *et al.* (1995) analisaram a mutagenicidade induzida pelo IRM[®], do super-EBA[®] e do MTA quando utilizados como materiais retrobturadores. Nenhuma mutação ocorreu, independentemente do material utilizado. Por sua vez os testes de citotoxicidade demonstraram que o MTA é menos citotóxico que o IRM[®] ou super-EBA[®], mas mais citotóxico que o amálgama (avaliado pelo teste do agar revestido). Quando o método de avaliação utilizado foi o radiocromo, o MTA apresentou menor citotoxicidade que todos os demais materiais avaliados.

Koh *et al.* (1997) testaram a produção de citocinas por osteoblastos em cultura na presença ou ausência do MTA. Observaram maior produção de IL-1 α , IL-1 e IL-6, quando o mesmo esteve presente. O GM-CSF não foi afetado estando presente em altas concentrações. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos, utilizando-se culturas de células MG-63 recuperadas de osteossarcoma humano, na presença ou não do MTA (Koh *et al.*, 1998).

Utilizando as mesmas células MG-63, Mitchell *et al.* (1999) observaram a produção de IL-6, grandes concentrações de IL-8 e ausência de IL-1 α e IL-11, além de produção de GM-CFS, na presença de MTA. É interessante ressaltar que, nesse estudo detectou-se uma pequena quantidade de IL-1 α , quando grandes quantidades de MTA foram dispostas na cultura, demonstrando sua biocompatibilidade e adequação para o uso clínico. Abdullah *et al.* (2002) também observaram altos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e osteocalcina na presença do MTA e de variantes do cimento de Portland.

Para se avaliar a citotoxicidade de materiais retrobturadores: amalgama, gallium GF2[®], ketac silver[®], e o agregado de trióxido mineral (MTA), Osório *et al.* (1998), realizaram culturas de fibroblastos L-929 e as expôs a esses materiais. As provas de citotoxicidade utilizadas foram o ensaio MTT e o ensaio de cristal violeta, para avaliar o número de células. Os resultados demonstraram que o MTA não foi citotóxico; gallium GF2[®] apresentou leve citotoxicidade; e ketac silver[®], super-EBA[®], e amálgama demonstraram elevados graus de citotoxicidade.

O MTA entra em contato direto com as células do ligamento periodontal após sua aplicação. Keiser *et al.* (2000) observaram, *in vitro*, que, após 24 horas em contato com culturas de fibroblastos humanos, o MTA não interferiu na viabilidade celular, apresentava melhores resultados que os outros materiais testados. A exceção ocorreu no grupo com altas concentrações de extratos em contato com MTA a fresco, onde ele apresentou viabilidade menor, porém, semelhante à dos outros materiais do grupo.

A aderência de fagócitos é um fator primordial na resposta celular e pode influenciar no crescimento e proliferação celular. Várias pesquisas avaliaram a aderência de osteoblastos (Koh *et al.*, 1997; Zhu *et al.* 2000; Pérez *et al.*, 2003) e células MG-63 (Koh *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2003) ao redor do MTA colocado nos poços de cultura com as respectivas células. Os resultados demonstraram que as células se espalhavam sobre o material, formando uma camada única. Tal fato confirma os achados quanto à excelente biocompatibilidade do MTA. Porém, Pérez *et al.* (2003) observaram que, apesar dos osteoblastos primários inicialmente se ligarem ao MTA branco, eles não sobrevivem após o 13^o dia.

Na literatura, há, até o momento, um único estudo em que se avaliaram os efeitos do MTA sobre culturas de macrófagos. Nele, Haglund *et al.* (2003) observaram que o MTA, exposto a fresco ou a seco às culturas de macrófagos, apresentou diminuição do crescimento celular.

Notou-se, contudo, que a fresco, o MTA induzia desnaturação de proteínas do meio e causava a morte celular adjacente ao material. Contudo, ao redor das culturas mortas, observava-se o crescimento celular normal. Quando exposto a seco, não foram observadas alterações na morfologia celular e não foi detectada produção de IL-1 β e IL-6.

2.11.5 Indicações

O MTA foi desenvolvido como material retrobturador para cirurgias periapicais e para selamento das comunicações entre o sistema de canal radicular e os tecidos adjacentes. Porém, atualmente, o MTA é largamente utilizado na terapia endodôntica. O MTA apresenta bons resultados quando utilizado em tratamentos de apexificações, em reparo de perfurações e capeamento direto, e quando utilizado como material retrobturador (Torabinejad *et al.*, 1999; Adamo *et al.*, 1999; Saidon *et al.*, 2003).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetiva avaliar o papel do MTA de duas marcas comerciais, quanto à sua capacidade de atuação nas respostas dos macrófagos M1 e M2.

3.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a viabilidade celular de macrófagos M1 e M2, em contato com o MTA-Ângelus – Odonto-lógika e o ProRoot – Tulsa Dental;
- b. Avaliar a capacidade de aderência dos macrófagos M1 e M2, após contato com o MTA-Ângelus – Odonto-lógika e o ProRoot - Tulsa Dental;
- c. Avaliar a capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2, após contato com o MTA-Ângelus – Odonto-lógika e o ProRoot - Tulsa Dental;
- d. Avaliar a produção de TNF, IL-12, IL-10, ROIs e NO pelos macrófagos M1 e M2, após contato com o MTA-Ângelus – Odonto-lógika e o ProRoot – Tulsa Dental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo avaliou a atividade fagocítica de macrófagos inflamatórios eliciados de duas linhagens de camundongos: C57BL/6 e C57BL/6 IL-12p40^{-/-}. Foram observadas: a viabilidade celular, a capacidade de aderência desses macrófagos, a fagocitose de *Saccharomyces boulardii*, também a produção de TNF, IL-12, IL-10, ROIs e NO, na presença e na ausência do MTA (ProRoot - Tulsa Dental e MTA-Ângelus – Odonto-lógica).

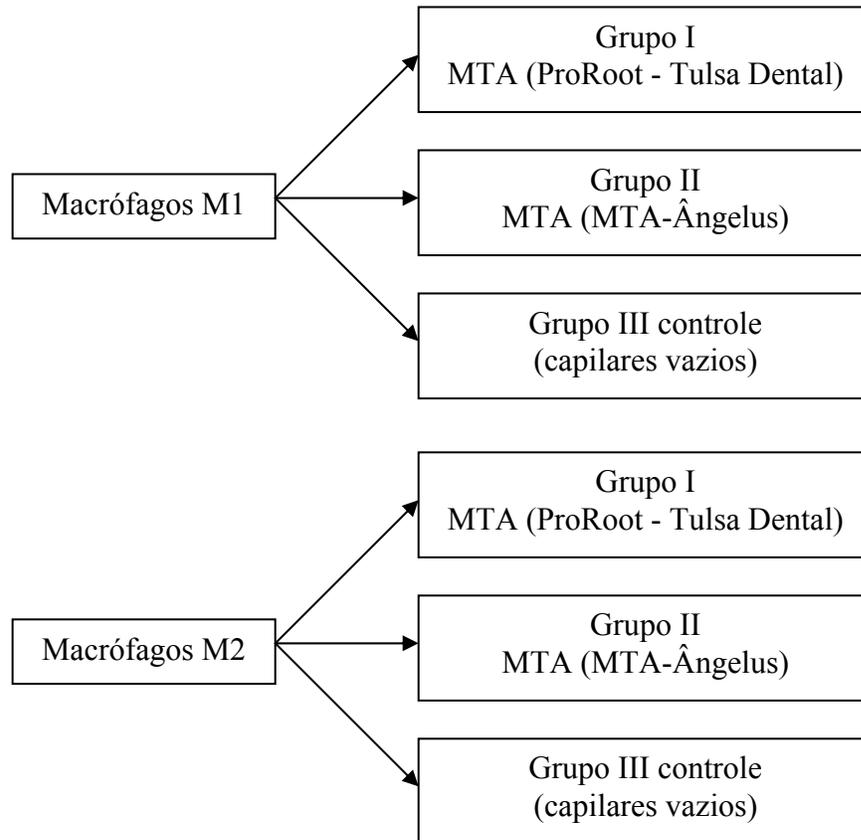
4.2 Plano Amostral

Para este experimento, foram constituídos três grupos:

- grupo I - capilares contendo MTA (ProRoot - Tulsa Dental);
- grupo II - capilares contendo MTA (MTA-Ângelus – Odonto-lógica);
- grupo III (grupo controle) - capilares vazios.

A biocompatibilidade desses cimentos foi testada frente a macrófagos de camundongos C57BL/6 (macrófagos M1) como também, em macrófagos de camundongos

C57BL/6 IL-12p40^{-/-} (macrófagos M2). Quando se mediu a produção de IL-10, IL-12, TNF, ROIs e NO, os grupos foram subdivididos: os expostos e os não expostos a diversos estímulos.



4.3 Animais e Microorganismos

Utilizaram-se duas linhagens de camundongos: C57BL/6 (cedidos pelo centro de bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais - CEBIO, Belo Horizonte, MG, Brasil) e camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-} (cedidos pelo laboratório de Gnotobiologia e Nutrição do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,

Brasil), machos e fêmeas de 4 a 8 semanas. Esses animais foram mantidos em biotério com barreiras, comida e água *ad libitum*. Cada grupo de 5 animais ficou alojado em gaiolas apropriadas de 20cmx30cmx20cm. O protocolo desse experimento foi autorizado pelo comitê de ética e pesquisa em animais (CETEA – UFMG n° 35/2002), em anexo.

Utilizaram-se neste trabalho, quatro tipos diferentes de microorganismos, a saber: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) (provenientes do laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil), *Saccharomyces boulardii* (obtida através de cápsulas de Floratil, Merk S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o Zymosam A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

As culturas de *F. nucleatum* foram repicadas em 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™ Yest extract, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foram, então, incubadas em estufa a 37°C, por 48h, em câmara de anaerobiose. O número de bactérias foi obtido pelo grau de absorbância de luz (1D.O. = 8×10^8 células/mL). Após a quantificação, as bactérias foram centrifugadas com 1500xg a 4°C, por 10 minutos e ressuspendidas em PBS (salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,4), a fim de obter uma solução com uma concentração de 10^9 células/mL. Essas foram levadas a autoclave até que a temperatura atingisse 100°C; ali permaneceram por 10 minutos (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). Após a morte dos microorganismos, os frascos foram mantidos sob refrigeração a 4°C. O *F. nucleatum* foi utilizado na proporção de 10:1 em relação ao número de macrófagos na cultura, nos experimentos de mensuração da produção para a TNF, IL-12, IL-10, e NO.

As culturas de *P. anaerobius* foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) enriquecido com 0,1% de Hemina, 0,1% de menadiona e 0,5% de extrato de levedura (Bacto™ Yest extract, Becton, Dickinson and Company, Frankilin Lates, NJ, EUA). Os procedimentos de incubação, quantificação, produção de antígeno e proporção de bactérias, em relação ao número de células utilizadas nas culturas, foram realizados de forma semelhante aos da cultura de *F. nucleatum*.

A levedura *S. boulardii*, antes dos experimentos, foi ressuspensa em PBS, até se obter a concentração de 10^7 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. (Mendes *et al.*, 2003).

O Zymosan A de *S. cerevisiae* foi diluído inicialmente em PBS. Em seguida, foi realizada a contagem do número de partículas em câmara de Neubauer. Após essa contagem e determinação da concentração final, foi diluído, novamente em PBS, até que a solução atingisse uma concentração de 10^9 partículas/mL. Essa solução foi armazenada sob refrigeração até o momento do experimento. Nos estudos 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).

A proporção do número de microorganismos utilizados/células em cultura, em cada experimento realizado, foi previamente, padronizado, em uma curva dose-resposta.

4.4 Preparo do MTA

Utilizaram-se duas diferentes marcas comerciais de MTA:

- ProRoot (gentilmente cedido pela Tulsa Dental[®] Maillefer, Ballaigues, Suíça) – constituído de 3 CaO-SiO₂ (Silicato Tricálcio), Bi₂O₃ (Óxido de Bismuto), 2 CaO-SiO₂ (Silicato Dicálcio), 3 CaO-Al₂O₃ (Aluminato Tricálcio), 4 CaO-Al₂O₃-Fe₂O₃ (Aluminoferrite Tetracalcio), CaSO₄-2H₂O (Sulfato de Cálcio Dihidratado ou Gypsum).
- MTA-Ângelus[®] (gentilmente cedido pela Odonto-lógika, Londrina – PR, Brasil) – constituído de SiO₂ (Dióxido de Silício), K₂O (Potássio), Al₂O₃ (Alumina), Na₂O (Óxido de Sódio), Fe₂O₃ (Óxido de Ferro), SO₃ (Trióxido de Enxofre), CaO (Óxido de Cálcio), Bi₂O₃ (Óxido de Bismuto), MgO (Óxido de Magnésio) e resíduos insolúveis (Sílica Cristalina, Óxido de Cálcio e Sulfato de Potássio e Sódio).

Os cimentos foram preparados de acordo com as especificações dos fabricantes, e sua manipulação foi realizada em fluxo laminar, em condições de esterilidade.

Após esse procedimento, os cimentos foram inseridos nas extremidades de tubos capilares (Mícron, Trianon Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), previamente cortados e esterilizados. Essa manobra permitiu que o contato dos cimentos com a suspensão celular fosse o mesmo para as diferentes situações (diâmetro do capilar de 3,52 mm²). Em seguida, eles foram armazenados em placa de cultura de 6 poços (Nunclon[™], Nalge Nunc International, Naperville, IL, EUA) para presa final. Os grupos controle foram representados pelos capilares vazios (Mendes *et al.*, 2003). Em seqüência, a placa foi submetida à irradiação com 25 kGray de raios Gama, no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTN), Belo Horizonte, MG, Brasil.

4.5 Obtenção e cultura de células peritoneais inflamatórias

Para obtenção de macrófagos inflamatórios da cavidade peritoneal, foi injetado nos camundongos, C57BL/6 e C57BL/6 IL-12p40^{-/-}, 2mL de tioglicolato a 3%, contendo 1% de ágar esterilizado (Biobras S.A.). Os animais foram sacrificados por decapitação, após 5 dias. Em seguida, foram-lhe injetados, rapidamente, na cavidade peritoneal, 10mL de meio RPMI 1640 esterilizado, sem o fenol vermelho (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA), com o auxílio de uma agulha de calibre 40x16, acoplada a uma seringa. O maior conteúdo possível foi aspirado com a mesma seringa, e as células foram centrifugadas com 350xg, por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640, sem o fenol vermelho, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 0,1% de solução de β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.) a 0,05M, 0,2% de gentamicina, 200mM de L-glutamina (meio completo). As células foram contadas em câmara de Neubauer, e a concentração final foi ajustada em 1x10⁵ células/mL para a detecção da viabilidade celular em placas de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International). Para o ensaio de fagocitose, utilizaram-se 5x10⁵ células/mL, 1x10⁶ células/mL para a verificação da aderência celular, viabilidade celular em tubo de polipropileno (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra) e produção de ROIs, e 2x10⁶ 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 CO₂, a 37°C.

4.6 Viabilidade celular

O estudo da viabilidade dos macrófagos frente ao substrato foi realizado em tubos de polipropileno (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra) e em placas de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International).

Ao se avaliar a viabilidade celular em tubos de polipropileno (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra), adicionou-se, à suspensão celular, capilares contendo ou não o MTA. Em seguida, as culturas foram levadas à estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C, por 24 horas. Após esse período, foram removidos 20µL da suspensão celular e colocados em tubo eppendorf, juntamente com o mesmo volume de azul de tripan (Sigma Chemical Co.) 0.25% em PBS. Esse conteúdo foi levado à câmara de Neubauer e analisado em microscópio óptico. Foram contadas as células vivas e as mortas, e os resultados expressos em porcentagem.

Ao se avaliar a viabilidade celular em em placa de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International), adicionou-se, à suspensão celular, capilares contendo ou não o MTA. Em seguida, essa placa de cultura foi incubada por 24, 48 ou 72 horas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C. A análise da viabilidade foi realizada em microscópio invertido, após o acréscimo de 100µL de solução de azul de tripan (Sigma Chemical Co.) 0,25% em PBS. Contaram-se as células vivas e as mortas, num total de, no mínimo, 300 células. Os resultados foram expressos em porcentagem (Mendes *et al.*, 2003).

4.7 Aderência de macrófagos ao substrato

O experimento sobre a aderência de macrófagos ao substrato foi realizado conforme método descrito por Lee *et al.* (1993) com pequenas modificações. Utilizaram-se tubos de polipropileno, estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra), nos quais foram adicionadas suspensões celulares contendo 1×10^6 células/mL em meio completo. Capilares previamente cortados, contendo as amostras de MTA e capilares vazios foram colocados nesses tubos. Após 2 horas de incubação, em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C, os tubos foram levados ao vortex por 5 segundos em baixa velocidade. Após a homogeneização, alíquotas de 20µL de cada amostra foram removidas, colocadas em câmaras de Neubauer, armazenadas em placas de petri umidificadas e novamente incubadas a 37°C, por uma hora. Em seguida, realizou-se a contagem dos macrófagos aderentes e dos não aderentes, pela microscopia óptica. A porcentagem de aderência foi encontrada dividindo-se o número de macrófagos aderentes pelo número total de células e multiplicado por 100.

4.8 Fagocitose da levedura *S. boulardii* in vitro

Para se verificar a interferência do MTA no processo de fagocitose dos macrófagos M1 e M2, utilizou-se à técnica descrita por Giaimis *et al.* (1992), com algumas modificações.

Colocaram-se lamínulas redondas (GlassTécnica, GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil) estéreis nos poços de uma placa de cultura de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International). Sobre essas lamínulas, foram colocadas 5×10^5 células/mL de suspensão celular em meio completo, e as placas foram levadas para a estufa de CO₂, a 37°C, por 2 horas. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi removido e descartado, as células foram lavadas uma vez com RPMI 1640, sem o fenol vermelho a 37°C e acrescentou-se 1 mL de RPMI 1640 sem fenol vermelho a 37°C, novo, aos poços. Em seguida, foram acrescentados 100µL da suspensão de *S. boulardii* (10^7 UFC leveduras/mL), mortas pelo calor, e os capilares com ou sem os cimentos. As placas foram incubadas por 1 hora em estufa de CO₂, à 37°C. Após esse período, as leveduras não ligadas foram delicadamente removidas em 3 lavagens com meio novo de RPMI 1640 sem fenol vermelho a 37°C. As lamínulas foram, então, cobertas com 1mL de ácido tânico a 1% (MERK S.A.), diluído em água destilada, durante 1 minuto, o que possibilitou a distinção entre as leveduras autoclavadas extra-celulares, que apresentam-se na coloração azul escuro a roxo, e as intra-celulares, na coloração rosa a azul clara, conforme descrito a seguir. Foi então realizada nova lavagem das células com meio RPMI 1640 sem fenol vermelho. Uma gota de soro bovino fetal foi colocada sobre cada lamínula para se evitar a cristalização do corante. A seguir, as lamínulas foram incubadas em estufa de secagem, a 37°C. Removeram-se as lamínulas circulares da placa de cultura que, posteriormente, foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, Brasil) como descrito. Após coloração e secagem das lamínulas, elas foram coladas em lâminas com Entellan (MERK S.A.). Após a secagem do Entellan, as lâminas foram observadas em microscopia ótica num aumento de 100X, em imersão. O número total de células: macrófagos com leveduras aderidas, macrófagos com leveduras fagocitadas e o número de leveduras

fagocitadas por macrófago, num total de no mínimo 200 células, foram contadas. Posteriormente, determinou-se a percentagem de macrófagos com levedura fagocitada, a percentagem de macrófagos com levedura aderida e o número de leveduras fagocitadas/células.

4.8.1 Coloração com Panótico Rápido

As lamínulas foram coradas com a técnica do Panótico Rápido: imersão de cada lamínula durante 5 segundos no Panótico nº 1, remoção do excesso, imersão, durante 5 segundos, no Panótico nº 2, remoção do excesso; em seguida, imersão das lamínulas no Panótico nº 3, também, durante 5 segundos. Para finalizar, lavagem em água corrente, para remoção do excesso de corante. Após a secagem, elas foram coladas em lâminas com Entellan.

4.8.2 Propriedade corante das leveduras

As leveduras vivas coradas exibem cor azul ou violeta, enquanto as leveduras autoclavadas exibem coloração rosa. No entanto, as leveduras autoclavadas, tratadas com ácido tânico, imediatamente antes da coloração, exibem a cor violeta. Essa propriedade corante pode ser utilizada na distinção de leveduras extracelulares das intracelulares, uma vez que, somente as leveduras autoclavadas extracelulares são acessíveis à solução de ácido tânico e apresentam,

assim, a cor violeta após a coloração, enquanto as leveduras ingeridas permaneceram com a cor rosa (Giaimis *et al.*, 1992).

4.9 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF)

Colocaram-se, em placas de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International), 1 mL de suspensão celular contendo 2×10^6 células/mL, acrescidas dos antígenos de *F. nucleatum* e de *P. anaerobius* (10^7 UFC/mL), com e sem $10 \text{ U}^1/\text{mL}$ de IFN- γ (Pharmingem, San Diego, CA., EUA) recombinante, além dos capilares, contendo ou não os cimentos em estudo. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h em estufa de CO₂ a 37°C. O sobrenadante da cultura foi recolhido e realizaram-se as leituras, utilizando-se os kits Duo Set Elisa TNF (Development System R&D Systems, Mineapolis, MN, EUA). A técnica proposta pelo fabricante e que foi aplicada, é a seguinte: 100 μL de anticorpo de captura (144 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como revestimento das placas de ELISA (Falcon, Becton Dickinson), na concentração de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão de revestimento (8,4mg/mL de NaHCO₃, 5,8mg/mL de NaCl em pH 9,6), quando então, as placas foram incubadas por 18-24h, a 4° C. Em seguida, bloqueou-se a reação com 200 μL de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS, por 1h, à temperatura ambiente; seguiram-se 5 lavagens com PBS-Tween 0,1% (Sigma Chemical Co.). O padrão de TNF foi colocado nos dois primeiros poços (concentração de 1000pg/mL) e, nos poços seguintes, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2. Na seqüência, foram acrescentados 100 μL dos sobrenadantes e 100 μL de albumina bovina a 1% em PBS, nos poços em branco. Após 18-24h de incubação a

4°C, as placas foram novamente lavadas cinco vezes, e 100µL do anticorpo de detecção (54µL/mL), em 1% BSA (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween 0,1% foram colocados em cada poço, durante 2h, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1%, e 100µL de 0,5% de estreptavidina, conjugada com peroxidase, em albumina bovina a 1%, em PBS-Tween, foram adicionados. Após 1h de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1%, e adicionados 100µL de solução de substrato, 0,5mg/mL de ABTS (ácido azinobistiozolinio sulfônico) (Sigma Chemical Co.) em tampão citrato/fosfato (17,8g/l Na₂HPO₄.2H₂O e 21,01g/l C₆H₈O₇.H₂O em pH 4,0), contendo 1µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos, interrompeu-se a reação, com 30µL de SDS 1%, quando fez-se a leitura em espectrofotômetro (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA) em um comprimento de onda de 405nm. Sensibilidade: 31,2pg/mL.

4.10 Detecção de Interleucina-12 (IL-12)

A obtenção do sobrenadante para dosagem da produção de IL-12 se deu de forma semelhante a do TNF. A produção de IL-12 foi lida, utilizando-se os kits Duo Set Elisa IL-12 p70 (Development System R&D Systems). Empregaram-se 100µL de anticorpo de captura (720µg/mL) como revestimento das placas de ELISA (Falcon, Becton Dickinson), na concentração de 4µg/mL em tampão de revestimento, e as placas foram incubadas por 18-24h, a 4° C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com 200µL de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical

¹ 1 µg corresponde a 8430U

Co.) em PBS, por 1h, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-Tween 0,1% (Sigma Chemical Co.). Em seqüência, o padrão de IL-12 foi colocado nos dois primeiros poços, em uma concentração de 1500pg/mL; nos poços seguintes, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2. Na seqüência, foram acrescentados 100µL dos sobrenadantes a serem analisados e 100µL de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween 1%, nos poços em branco. Após 18-24h de incubação à 4°C, as placas foram novamente lavadas cinco vezes, e 100µL do anticorpo de detecção (72µL/mL) em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.), em PBS-Tween, foram colocados em cada poço, durante 2h, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1%, e 100µL de 0,5% de estreptavidina, conjugada com peroxidase em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.), em PBS-Tween foram adicionados. Após 1h de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1% e adicionados 100µL de solução de substrato, 0,5mg/mL de ABTS (Sigma Chemical Co.) em tampão citrato/fosfato pH 4,0, contendo 1µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos, essa reação foi interrompida, com 30µL de SDS a 1%, quando se fez a leitura em espectrofotômetro (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA) em um comprimento de onda de 405nm. Sensibilidade: 23,4pg/mL.

4.11 Detecção de Interleucina-10 (IL-10)

A produção de IL-10 foi analisada de forma semelhante à das outras citocinas quantificadas neste estudo, porém o sobrenadante foi recolhido após 72 horas de incubação,

quando se, realizou a leitura, utilizando-se os kits Duo Set Elisa IL-10 (Development System R&D Systems). Utilizaram-se 100 μ L de anticorpo de captura (360 μ g/mL), como revestimento das placas de ELISA (Falcon, Becton Dickinson) na concentração de 2 μ g/mL em tampão de revestimento (pH 9,6). As placas foram, então, incubadas por 18-24h, a 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com 200 μ L de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS, por 1h, à temperatura ambiente. As placas foram, a seguir, lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1% (Sigma Chemical Co.). O padrão de IL-10 foi colocado nos dois primeiros poços, estando eles a uma concentração de 2000pg/mL. Nos poços seguintes realizaram-se diluições sucessivas de 1:2. Em seguida, foram acrescentados 100 μ L dos sobrenadantes e 100 μ L de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween, nos poços em branco. Após 18-24h de incubação à 4°C, as placas foram novamente lavadas cinco vezes e 100 μ L do anticorpo de detecção (72 μ L/mL) em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween foram colocados em cada poço, durante 2h, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1%, e 100 μ L de 0,5% de estreptavidina conjugada com peroxidase em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween foram adicionados. Após 1h de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,1% e adicionados 100 μ L de solução de substrato, 0,5mg/mL de ABTS (Sigma Chemical Co.) em tampão citrato/fosfato pH 4,0, contendo 1 μ L/mL de peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos, essa reação foi interrompida, com 30 μ L de SDS a 1% e fez-se a leitura em espectrofotômetro (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA) em um comprimento de onda de 405nm. Sensibilidade: 15,6pg/mL.

4.13 Detecção de radicais livres de oxigênio (RLOs)

A mensuração da produção de radicais livres de oxigênio foi realizada conforme a técnica descrita por Trusk *et al.* (1978), com algumas alterações. A suspensão celular com 1×10^6 células/mL foi incubada, juntamente com os capilares com ou sem MTA, por 24 horas, em tubos de polipropileno estéreis, em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período de incubação, os tubos de polipropileno foram levados à centrífuga com 350xg, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e acrescentados 100µL de RPMI 1640 sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.) em cada tubo de polipropileno. Todo esse conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços, contendo 70µL de RPMI 1640, sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.) em cada poço a ser utilizado. No momento da leitura da placa, foram adicionados 10^7 partículas de zymosan/mL, e 10µL de luminol, diluído 1:10 em RPMI 1640, sem o fenol vermelho; a solução de stock do luminol foi realizada pela dissolução de 1,77mg dele em 1mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Só então, a placa foi levada ao Lumicount™ (Packard Bioscience Company). Tem sido observada a emissão de luz, associada à liberação de radicais livres de oxigênio. Essa luz, porém, é muito fraca e não pode ser facilmente utilizada em sistemas de análise, como um meio de mensuração do processo de fagocitose. Porém, a produção de luz pode ser amplificada pela adição de componentes, como o luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1, 4-alazinedione), que interage com os ROIs para produzir maior intensidade luminosa com um pico de comprimento de onda de aproximadamente 425nm.

4.13 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

Os procedimentos foram semelhantes àqueles descritos para dosagem de IL-10. Após o período de incubação das placas contendo as culturas celulares, o sobrenadante da cultura foi recolhido e avaliado para a presença de NO. A produção de nitritos nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pelo método de Green *et al.* (1982), com algumas adaptações. Resumindo: 50µL dos sobrenadantes de cultura foram colocados em placas de 96 poços (Corning, Corning, NY, EUA), acrescidos de 50µL de RPMI 1640, sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.), nos poços em branco e nos poços da curva padrão. Em seguida, acrescentaram-se 100µL de solução estoque de NaNO₂ a 100µM, previamente diluídos 1:200 nos primeiros poços da curva padrão, quando se realizaram diluições sucessivas de 1:2, nos poços seguintes. Por fim, foram adicionados 100µL de uma mistura de sulfanilida a 1%, em ácido fosfórico 2,5%, e naftiletilenodiamida 1%, em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em leitor de ELISA (Bio-Rad 2550, Hercules, EUA) a 540 nm. A quantidade de nitrito foi calculada, usando-se uma curva padrão de nitrito de sódio (125µM a 0,977µM). Sensibilidade: 0,5µM.

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pela empresa Logostat consultoria e assessoria estatística. Os dados foram analisados por testes paramétricos e não-paramétricos. O teste paramétrico utilizado foi representado pela análise de variância (ANOVA); os testes não-paramétricos foram os de Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Foram analisados: o efeito do tipo de macrófago, o efeito da presença das duas marcas comerciais do MTA, como também das diversas situações apresentadas aos macrófagos (presença de antígenos bacterianos, leveduras e IFN- γ) em algumas situações experimentais, e a interação entre esses fatores. Todos os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas num software SPSS 8.0 Inc. (Statistical Package for Social Sciences).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

Como foi mencionado anteriormente, a viabilidade celular foi testada em duas situações: em tubos de polipropileno e em placas de 24 poços.

5.1.1 Viabilidade celular em tubos de polipropileno

Objetivando verificar a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais nos experimentos de observação da aderência e da produção de ROIs, foi utilizada a técnica de exclusão do azul de tripan, em células pré-incubados com os capilares preparados. A concentração celular utilizada foi de 1×10^6 células/mL, e o tempo de incubação com os capilares preparados foi de 24 horas, à semelhança dos dados utilizados nos experimentos já citados. A média da viabilidade celular foi maior que 80% em todos os casos. Em uma análise geral do tipo celular, foi observado que os macrófagos M1 apresentaram maior viabilidade celular do que os macrófagos M2 ($p < 0,05$). Além disso, constatou-se que não existiram interferências das duas marcas comerciais do MTA nem da relação entre o tipo de cimento e o tipo de macrófago na proporção de células vivas. Vide GRÁF. 1 e 2 e TAB. 1 a 3 (em anexo). Para verificar o papel do

tipo de macrófago e do cimento, na proporção de células vivas, utilizou-se à transformação logito² do modelo de análise de variância (ANOVA).

² Transformação logito: $\ln(p/1-p)$.

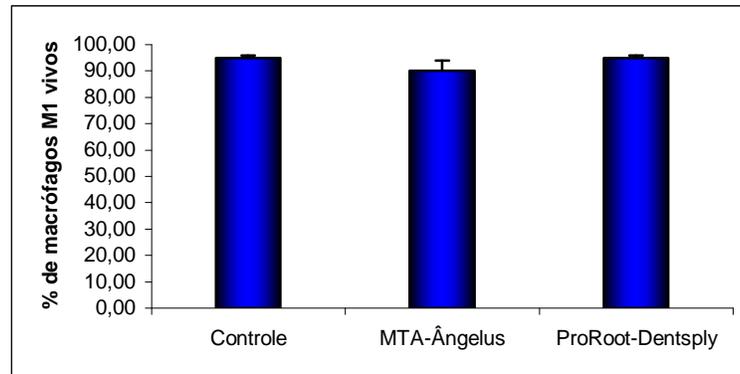


GRÁFICO 1 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6) vivos, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares, com ou sem o MTA das duas marcas comerciais. T indica o erro padrão.

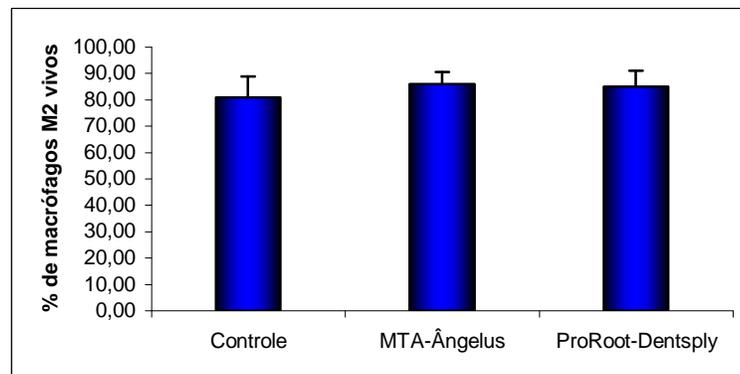


GRÁFICO 2 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) vivos, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares, com ou sem o MTA das duas marcas comerciais. T indica o erro padrão.

5.1.2. Viabilidade celular em placa de 24 poços

O estudo sobre a viabilidade das células peritoneais M1 e M2 de camundongos, na presença e ausência dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais, foi realizado incubando-se 1×10^6 células/mL por 24, 48 e 72 horas, na presença dos capilares. A técnica utilizada foi a mesma para a detecção da viabilidade em tubo de polipropileno (técnica de exclusão do azul de tripan), em células pré-incubadas com os capilares preparados. Os resultados podem ser vistos nos GRÁF. 3 e 4 e nas TAB. 4 a 6 (localizados no anexo). Constatou-se que a média da viabilidade celular foi maior que 97% em todos os casos. Não houve diferença no percentual de células vivas entre os dois cimentos estudados. Em relação ao tipo de macrófago, verificou-se que a proporção de células vivas é estatisticamente maior nos macrófagos M2. Porém, ao se analisar a existência de relação entre as marcas comerciais do MTA, o tipo de macrófago e o tempo de incubação, observou-se que: diferença estatisticamente significativa ocorre apenas frente ao cimento MTA-Ângelus, no tempo de 24 horas ($p < 0,05$). Observou-se que para os macrófagos M1, o tempo de incubação não influenciou no percentual de células vivas, porém, para os macrófagos M2, esse percentual foi estatisticamente menor, no tempo de 72 horas, do que nos demais tempos ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizada como se segue:

- Tipo de macrófago X viabilidade celular: teste de Mann-Whitney;
- Tipo de cimento X viabilidade celular: teste de Kruskal Wallis;
- Tempo de incubação X viabilidade celular: teste de Kruskal Wallis;
- Interrelação dos três fatores: testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis.

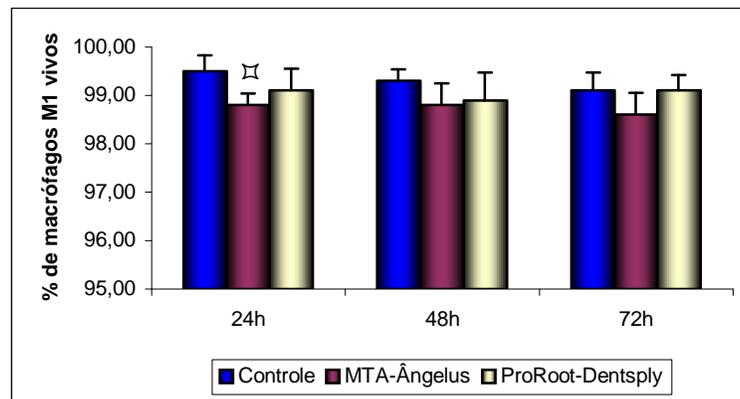


GRÁFICO 3 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6) vivos após 12, 24 e 48 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem MTA das duas marcas comerciais. O resultado é a média de 3 experimentos realizados em duplicatas. \neq $p < 0,05$ comparando o cimento MTA-Ângelus no tempo de 24h para os macrófagos M1, com o mesmo cimento e tempo para os macrófagos M2 (vide gráfico abaixo). T indica o erro padrão.

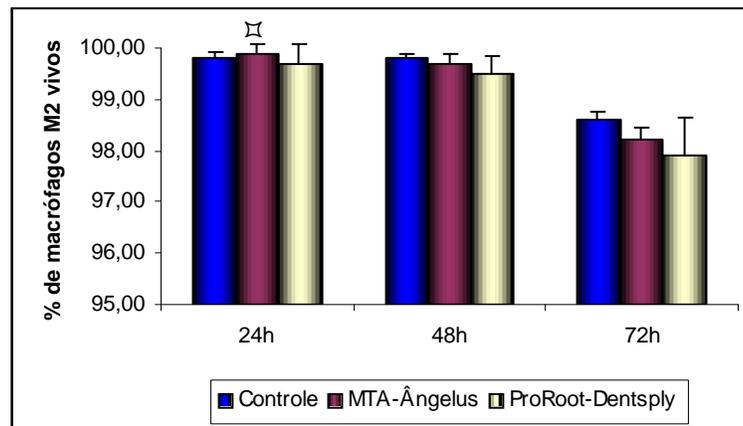


GRÁFICO 4 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) vivos após 12, 24 e 48 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem MTA das duas marcas comerciais. O resultado é a média de 3 experimentos realizados em duplicatas. \neq $p < 0,05$ comparando o cimento MTA-Ângelus no tempo de 24h para os macrófagos M1, com o mesmo cimento e tempo para os macrófagos M2. T indica o erro padrão.

5.2 Aderência celular

O segundo objetivo deste estudo foi o de verificar, *in vitro*, se os cimentos MTA-Ângelus e ProRoot – Tulsa Dental, interfeririam na aderência de macrófagos M1 e M2. Os resultados observados neste experimento estão expressos nos GRÁF. 5 e 6 e nas TAB. 7 a 9 (localizados no anexo). Verificou-se que, nem os cimentos das duas marcas comerciais, nem os tipos de macrófagos, ou a relação entre esses dois fatores interferiram na proporção de células aderentes. Esses resultados foram obtidos após análises estatísticas: teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para verificar o papel de cada tipo de macrófago na aderência celular; e o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis para verificar o efeito do cimento na mesma relação.

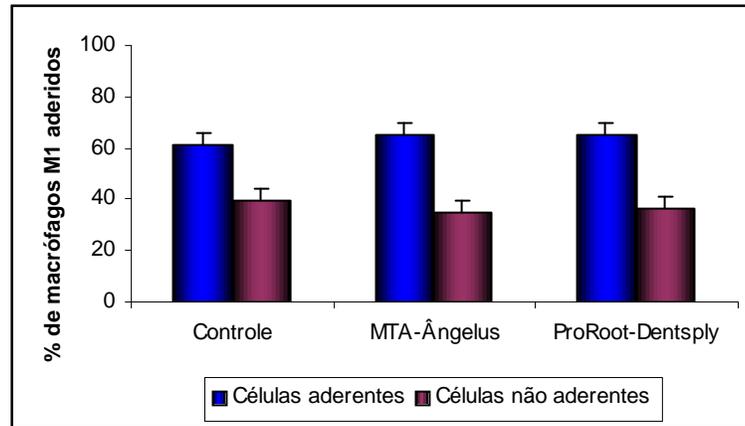


GRÁFICO 5 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), aderentes e não aderentes, após 2 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

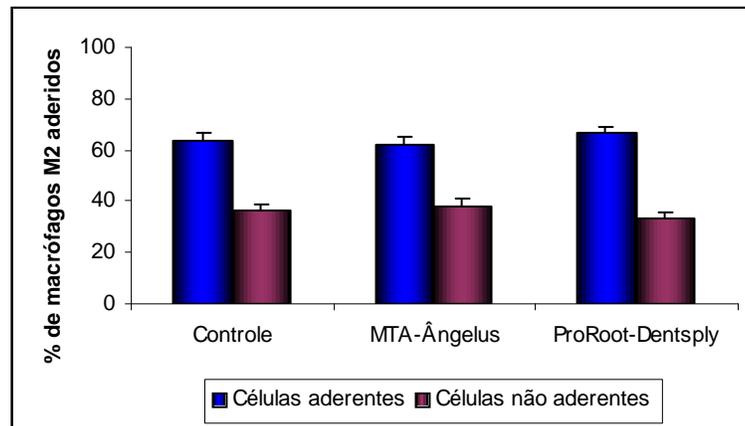


GRÁFICO 6 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), aderentes e não aderentes após 2 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

5.3 Fagocitose

A fagocitose é um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecção por patógenos. É realizada por células especializadas, os fagócitos mononucleares, que aderem a microorganismos, a células ou a debris celulares, e a substâncias inertes, promovendo, em seguida, sua eliminação (Giannis *et al.*, 1992; Siqueira *et al.*, 2000). Com o intuito de verificar a interferência das duas marcas comerciais de MTA, no processo de fagocitose das linhagens celulares, foi colocada, em contato com os macrófagos aderidos e os capilares, a levedura *S. boulardii*. As lamínulas foram tratadas com ácido tânico que possibilitou distinção entre as leveduras fagocitadas, presentes nas cores rósea e azul claro, e as leveduras aderidas, presentes, nas cores violeta e azul escuro (vide FIG.1). Esta diferença de coloração encontrada, entre as leveduras autoclavadas intracelulares, ocorreu em função da coloração dos diferentes tipos de macrófagos ter sido realizada em dias diferentes. Os resultados estão expressos nos GRÁF. 7 a 10, FIG. 1 a 6 e nas TAB. 13 a 17 (localizados no anexo). Observou-se que não existe interferência dos tipos de macrófagos e dos cimentos das duas marcas comerciais no percentual de macrófago com levedura fagocitada, nem no percentual de macrófago com levedura aderida. Porém, com relação ao número de leveduras fagocitadas/número de células, observou-se que, nos macrófagos M2, esse número se encontrava mais elevado do que nos macrófagos M1 ($p < 0,05$). No entanto, não foram constatadas diferenças estatísticas no tratamento com os dois cimentos, nessa variável. Outro dado importante observado foi a presença de estruturas birrefringentes no interior de alguns macrófagos em contato com os cimentos. Essas estruturas parecem ser partículas do cimento fagocitadas pelos macrófagos (vide FIG. 4 e 5). Utilizou-se o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney para verificar a relação do tipo de macrófago com

o percentual de células com leveduras fagocitadas. O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para verificar o efeito dos cimentos sobre o percentual de células com leveduras fagocitadas. Para analisar o efeito dos cimentos e do tipo de macrófago, no percentual de macrófagos com levedura aderida, e no número de leveduras fagocitadas/número de células, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA).

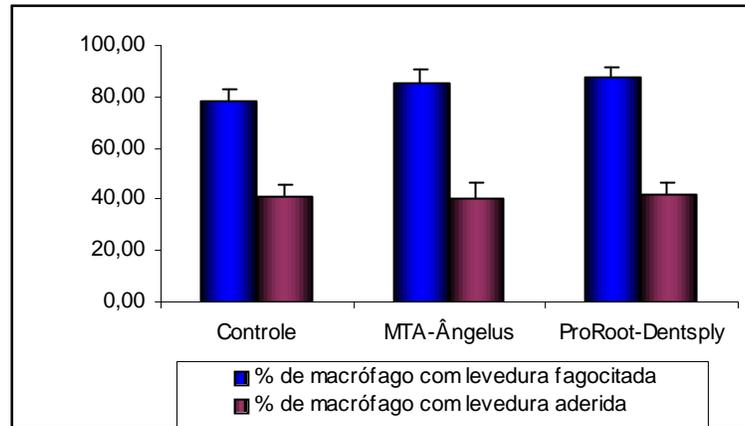


GRÁFICO 7 – Porcentagem de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), com levedura aderida e fagocitada, após 1 hora de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10^7 leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

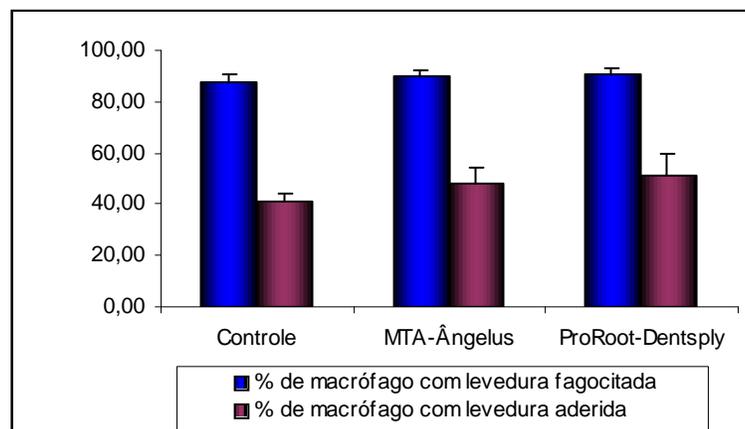


GRÁFICO 8 – Porcentagem de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), com leveduras aderidas e fagocitadas, após 1 hora de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10^7 leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

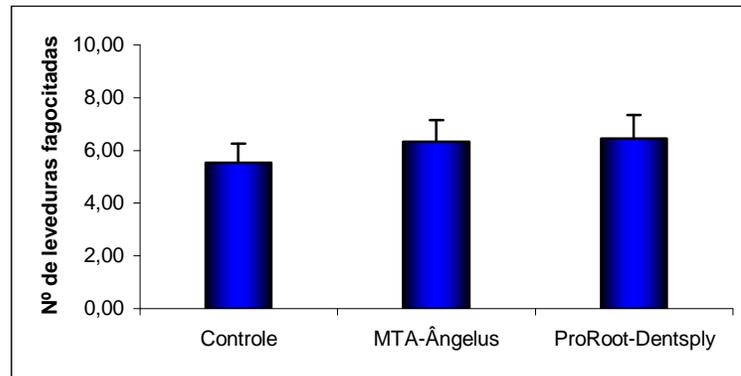


GRÁFICO 9 – Número de leveduras fagocitadas/macrófago M1 (camundongos C57BL/6), após 1 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10^7 leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

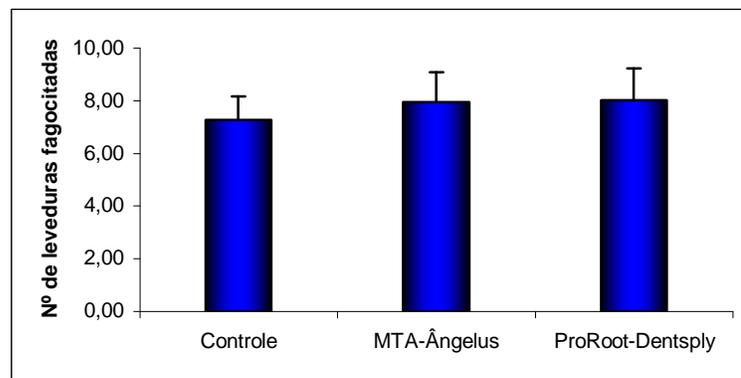


GRÁFICO 10 – Número de leveduras fagocitadas/macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 1 horas de incubação na presença dos capilares, com ou sem cimento MTA-Ângelus e ProRoot e 10^7 leveduras/mL de *S. boulardii*. O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. T indica o erro padrão.

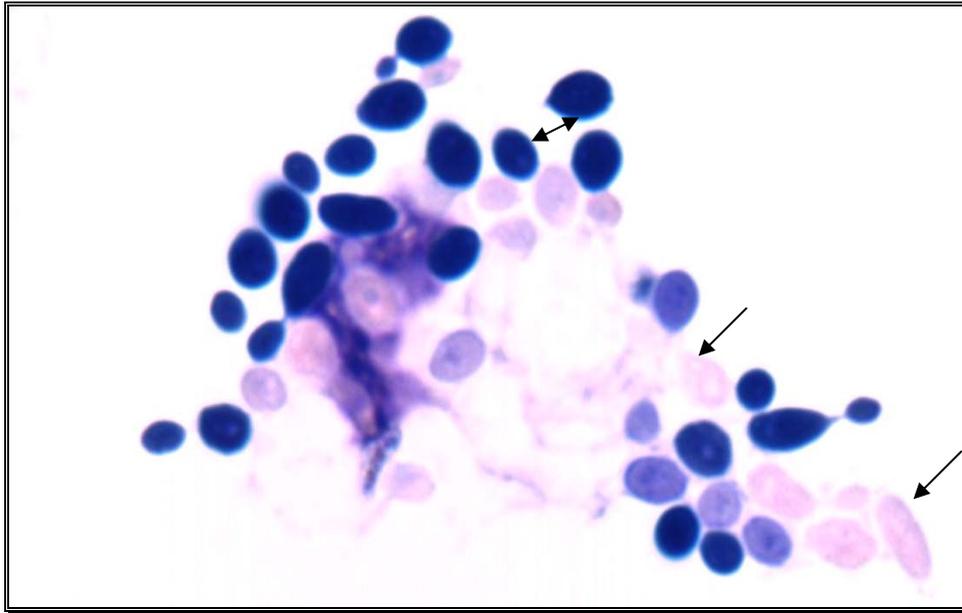


FIGURA 1 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares vazios, apresentando leveduras fagocitadas em tom rosa (vide seta) e leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

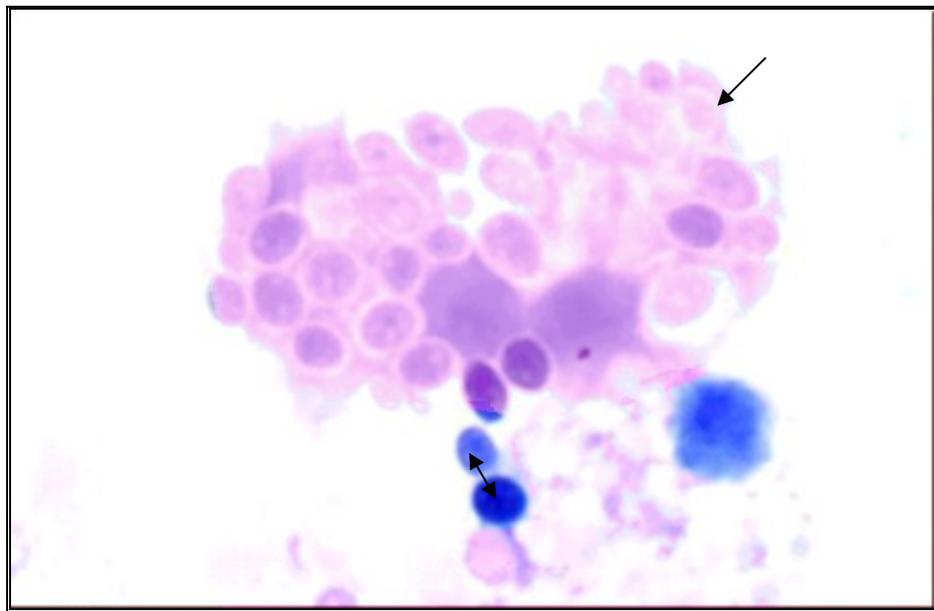


FIGURA 2 – Macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) em contato com capilares vazios, apresentando muitas leveduras fagocitadas em tom rosa (vide seta) e poucas leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

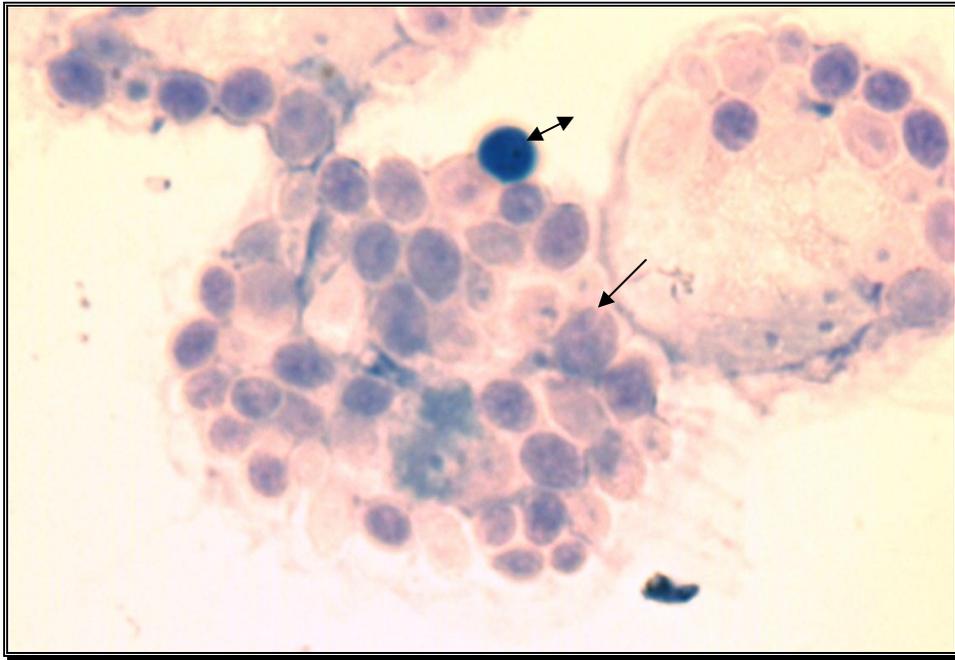


FIGURA 3 – Macrófago M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}) em contato com capilares com ProRoot, apresentando muitas leveduras fagocitadas em tom azul claro (vide seta) e poucas leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

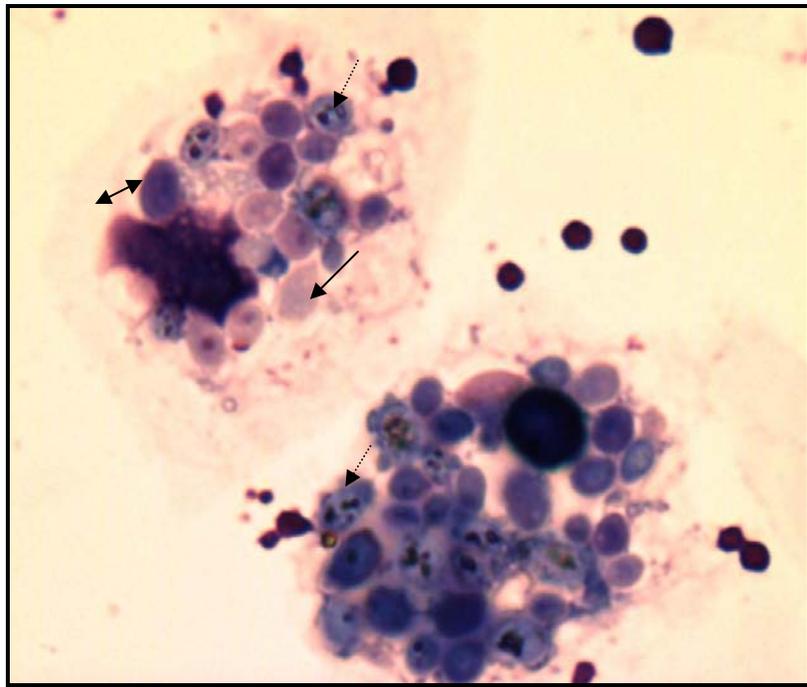


FIGURA 4 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com MTA-Ângelus, apresentando algumas leveduras fagocitadas em tom rosado (vide seta) e muitas leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Presença de estruturas birrefringentes próximas à estrutura das leveduras (vide seta intermitente). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

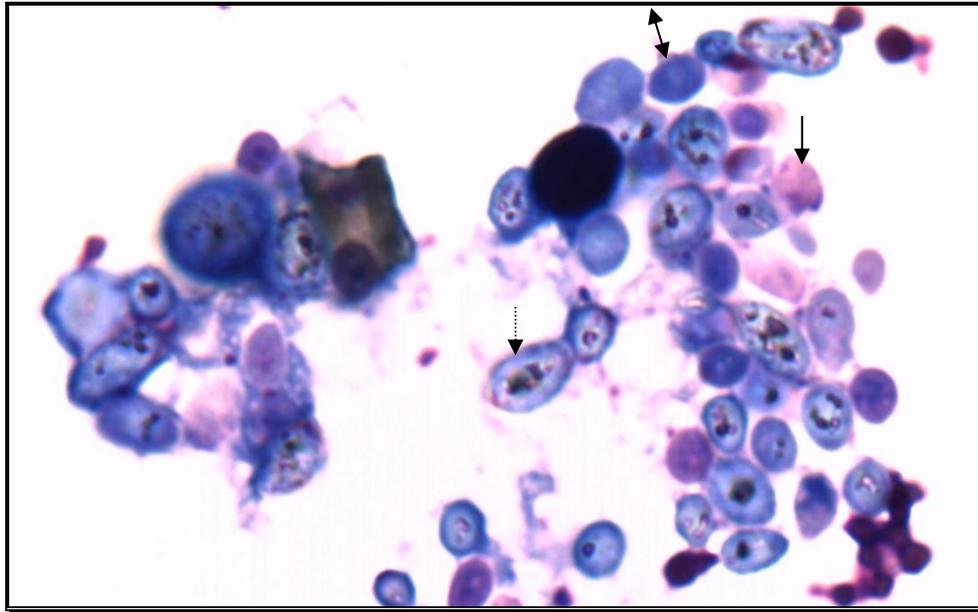


FIGURA 5 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com MTA-Ângelus, apresentando algumas leveduras fagocitadas em tom rosado (vide seta) e muitas leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Presença de estruturas birrefringentes próximas à estrutura das leveduras (vide seta intermitente). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

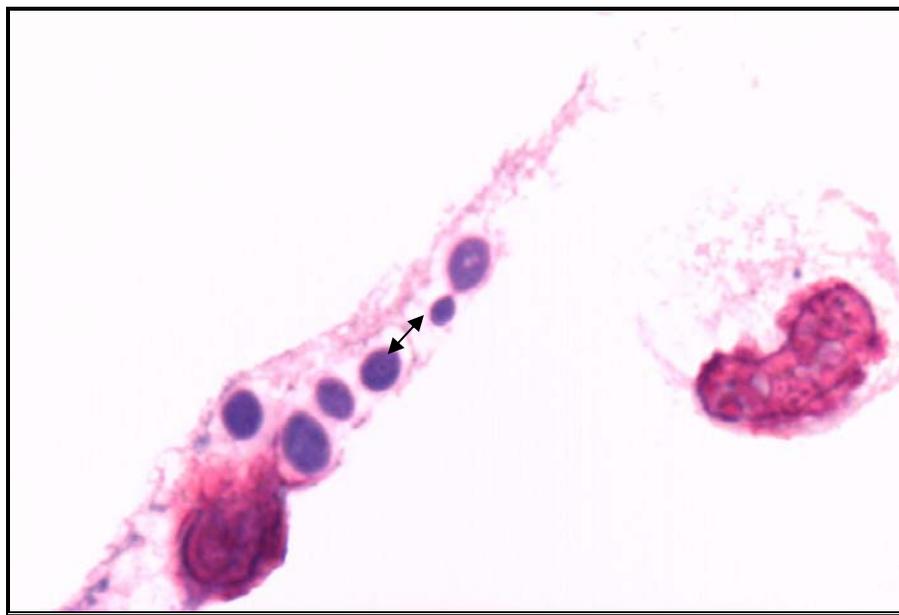


FIGURA 6 – Macrófago M1 (camundongos C57BL/6) em contato com capilares com ProRoot, apresentando algumas leveduras aderidas em tom violeta (vide seta dupla). Aumento de 1000x em objetiva de imersão.

5.4 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas, a outras infecções microbianas, e é responsável por muitas complicações sistêmicas resultantes de infecções severas. A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção, e ativar essas células para erradicar microorganismos (Abbas *et al*, 2000). Com o objetivo de verificar a produção de TNF em culturas de macrófagos estimulados com o MTA, colocou-se nos poços de uma placa de cultura de 24 poços, a suspensão celular com os capilares (com ou sem cimento) acrescidos dos seguintes antígenos bacterianos: *F. nucleatum*, com e sem IFN- γ , e *P. anaerobius*, com e sem IFN- γ . Os resultados estão expressos nos GRÁF. 11 e 12 e nas TAB. 18 a 20 (localizados no anexo). Observou-se uma pequena produção de TNF apenas pelos macrófagos em contato com o cimento. Não se verificou diferença estatística entre os cimentos estudados nem entre os macrófagos M1 e M2. Com relação aos estímulos utilizados, nos macrófagos M1 foi observada diferença estatística entre os poços onde eles foram expostos apenas aos capilares, e os do grupo dos macrófagos estimulados com *P. anaerobius*, IFN- γ e os capilares. No grupo estimulado com *F. nucleatum*, IFN- γ e os capilares, a produção de TNF também se apresentou maior do que nos grupos estimulados por essa bactéria e os capilares, porém, sem significado estatístico. Nas culturas de macrófagos M2, observaram-se diferenças entre os grupos: macrófagos apenas com os capilares e macrófagos estimulados com *F. nucleatum*, IFN- γ e os capilares; nos grupos dos macrófagos com os capilares e o grupo dos macrófagos com *P. anaerobius*, IFN- γ e os capilares; nos grupos dos macrófagos com *F. nucleatum* e os capilares e os dos macrófagos com *F.*

nucleatum, IFN- γ e os capilares; nos grupos dos macrófagos com *F. nucleatum*, IFN- γ e os capilares e no grupo dos macrófagos com *P. anaerobius* e os capilares; nos grupos dos macrófagos com *P. anaerobius* e os capilares e o grupo dos *P. anaerobius*, IFN- γ e os capilares. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para verificar o efeito do tipo de macrófago na produção de TNF e o teste de Kruskal Wallis, para verificar o efeito das duas marcas comerciais do cimento como também o efeito dos estímulos utilizados (presença de bactérias gram-positiva e gram-negativa e o IFN- γ) na produção de TNF. Estes dois testes também foram utilizados para verificar a interação entre estes 3 fatores (cimento, tipo de macrófago e estímulo utilizado).

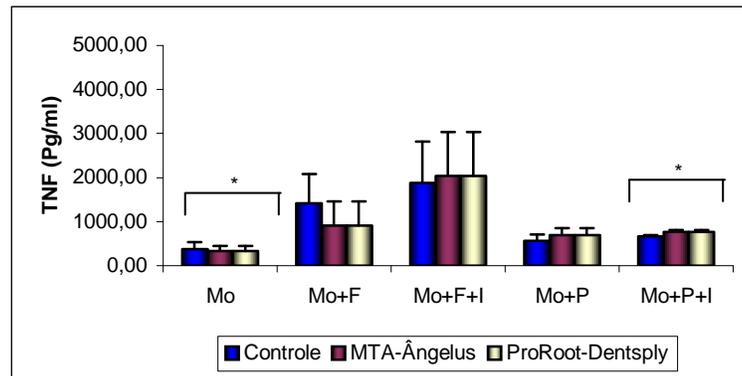


GRÁFICO 11 – Produção de TNF por culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ comparando o grupo dos macrófagos apenas com os capilares com o dos macrófagos com *P. anaerobius*, IFN- γ e os capilares. Sensibilidade do teste: 31,2pg/mL. T indica o erro padrão.

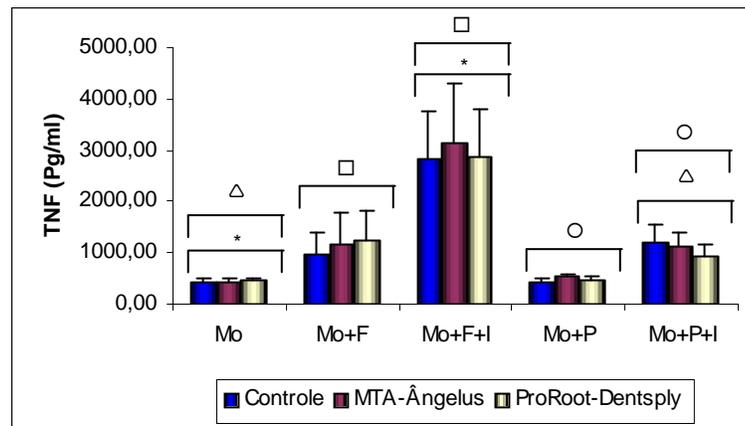


GRÁFICO 12 – Produção de TNF por culturas de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 24h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados independentemente. *, ○, Δ, □ $p < 0,05$ quando comparados os grupos indicados. Sensibilidade do teste: 31,2pg/mL. T indica o erro padrão.

5.5 Detecção de Interleucina-12 (IL-12)

A IL-12 é uma importante citocina, que interliga a resposta imune inata à adaptativa, porque direciona a diferenciação do padrão de células T; é produzida pela ativação de monócitos e células dendríticas (Rogge *et al.*, 1997). Verificou-se a produção basal de IL-12p70 por macrófagos na presença e ausência, de antígenos bacterianos de *F. nucleatum* com e sem IFN- γ recombinante e de *P. anaerobius*, com e sem IFN- γ , na presença ou ausência dos cimentos testados, por 24 horas. Os resultados estão expressos no GRÁF. 13 e nas TAB. 21 e 22 (localizados no anexo). Não foi realizada dosagem de IL-12 nos macrófagos M2, pois essas culturas foram recuperadas de camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}, portanto, esse resultado seria nulo. Foram observados baixos níveis de produção de IL-12p70, sendo que, em muitos grupos, mesmo naqueles com presença de bactérias, os níveis de IL-12 produzidos apresentaram-se abaixo do nível de detecção. Outro dado observado: a produção de IL-12 aumentou com o acréscimo de IFN- γ nos grupos nos quais as bactérias também estavam presentes, porém esse aumento não foi considerado estatisticamente significativo. Também não foram observadas diferenças estatísticas nas medidas obtidas dos poços estimulados com o MTA das duas marcas comerciais. A relação entre o cimento, a presença das bactérias e o IFN- γ , nos grupos em que a produção de IL-12p70 pode ser detectada, também, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Os resultados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal Wallis, para se verificar o efeito das duas marcas comerciais do cimento sobre a produção de IL-12, e o efeito dos estímulos utilizados (presença de bactérias gram-positiva e gram-negativa e o IFN- γ) e a relação entre esses dois fatores.

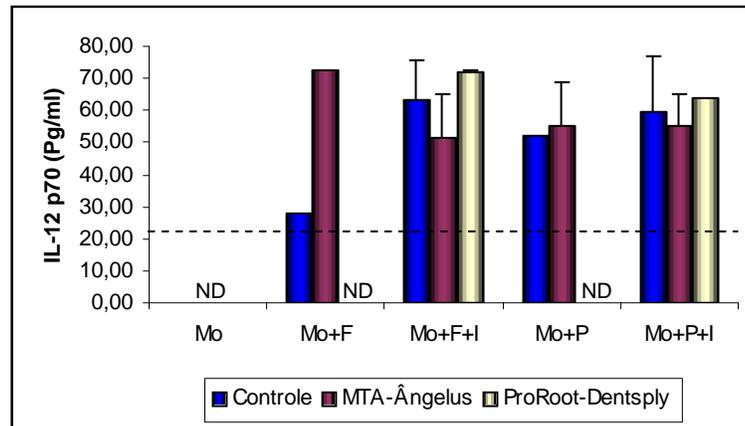


GRÁFICO 13 – Produção de IL-12p70 em culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 24h de incubação, na presença ou ausência dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P), com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. - - - indica a sensibilidade do teste (23,4pg/mL). ND indica produção abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão.

5.6 Detecção de Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é uma interleucina inibidora da ativação macrofágica, envolvida no controle homeostático das reações imune inata e imunidade celular (Abbas *et al.*, 2000). Verificou-se a produção basal de IL-10 por macrófagos inflamatórios, estimulados, *in vitro* ou não, com antígenos de *F. nucleatum*, com e sem IFN- γ e *P. anaerobius*, com e sem IFN- γ , na presença ou ausência dos cimentos testados, por 72 horas. Os resultados estão expressos nos GRÁF. 14 e 15 e nas TAB. 23 a 25 (localizados no anexo). Observou-se que, nos grupos com ausência de bactérias e IFN- γ , a produção de IL-10 não foi detectada. Com relação aos cimentos, a sua presença não afetou a produção de IL-10, sozinhos e na presença dos estímulos, tanto nos macrófagos M1 quanto nos M2. Porém, com relação ao tipo de macrófago, mesmo observando uma produção maior de IL-10 pelos macrófagos M2 do que pelos macrófagos M1, estatisticamente essa relação só se verificou nos grupos em que o *F. nucleatum* estava presente. Com relação aos estímulos utilizados (antígenos de *F. nucleatum* com e sem IFN- γ e de *P. anaerobius* com e sem IFN- γ), neste experimento, observou-se diferença entre os mesmos, apenas para os macrófagos M2, sendo que a dosagem de IL-10 foi estatisticamente maior nos grupos em que o *F. nucleatum* estava presente, do que nas demais situações experimentais. Os resultados foram analisados pelos testes de análise de variância (ANOVA), e o de comparações múltiplas de Tukey (para a comparação dos grupos dois a dois), a fim de verificar o efeito do tipo de macrófago, do cimento e dos diversos estímulos utilizados (presença de bactéria gram-positiva e gram-negativa e de IFN- γ), sobre a produção da citocina.

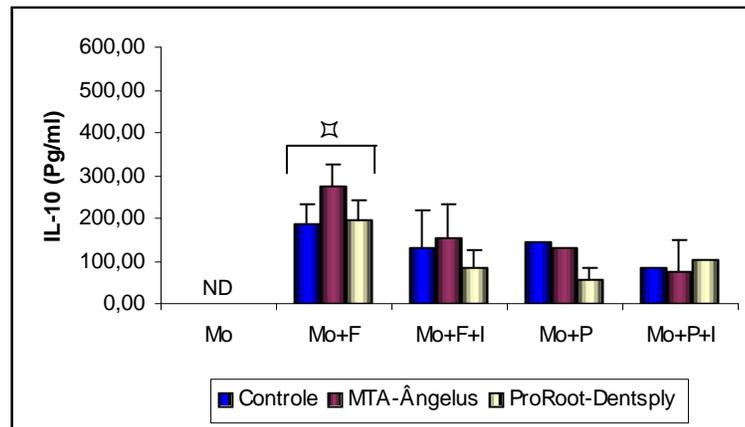


GRÁFICO 14 – Produção de IL-10 por culturas de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 72h de incubação, na presença ou ausência dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados em duplicata. Ψ $p < 0,05$ comparando o grupo dos macrófagos estimulados com *F. nucleatum*, e com os capilares entre os macrófagos M1 e M2 (vide gráfico abaixo). Sensibilidade do teste: 15,6pg/mL. ND indica abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão.

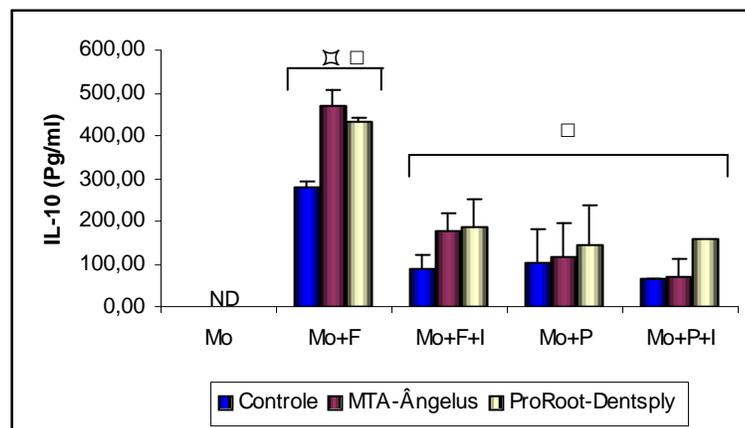


GRÁFICO 15 – Produção de IL-10 por culturas de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de três experimentos realizados em duplicata. \square $p < 0,05$ comparando o grupo do macrófago estimulado com *F. nucleatum* e os capilares e os demais grupos do M2. Ψ $p < 0,05$ comparando o grupo dos macrófagos estimulados com *F. nucleatum* e os capilares para os macrófagos M1 e M2. Sensibilidade do teste: 15,6pg/mL. ND indica produção abaixo do nível de detecção. T indica o erro padrão.

5.7 Detecção de radicais livres de oxigênio (ROIs)

Um dos mecanismos de eliminação de microorganismos fagocitados é pela produção ROIs. Após aproximadamente 1 minuto de exposição a um estímulo adequado, ocorre aumento no consumo de oxigênio dos fagócitos polimorfonucleares e mononucleares, levando-os à explosão respiratória que dará origem aos ROIs (Absolom, 1986). Neste estudo, 1×10^6 células/mL foram pré-incubadas com os cimentos, com ou sem cimento, por 24h e expostas a 10^7 partículas/mL de zymosan. A presença de ROIs foi revelada pela excitação do luminol. Os resultados dos picos de produção de ROIs pelos dois tipos celulares, frente a cada um dos cimentos estudados e na presença e não do estímulo com o zymosan, estão expressos nos GRÁF. 16 a 19 e TAB. 26 a 28 (localizados no anexo). Como se observou, a produção de ROIs pelos macrófagos M1 foi estatisticamente superior à produção de ROIs pelos macrófagos M2 ($p < 0,05$). Com relação à presença do estímulo, a produção de ROIs é estatisticamente maior nos grupos estimulados com zymosan. Nos grupos não estimulados, houve uma pequena produção basal de ROIs ($p < 0,05$). Com relação aos cimentos analisados, apesar de serem visualizadas diferenças entre os cimentos, durante a cinética da produção de ROIs, quando se analisou o pico dessa produção, não se detectou diferença estatística entre os mesmos. Após a leitura, escolheram-se os picos da produção de ROIs frente aos cimentos para a realização da análise estatística. Para a análise dos dados, utilizou-se a transformação inversa³ do modelo de análise de variância (ANOVA).

³ Transformação inversa: $1/(\text{resposta})$.

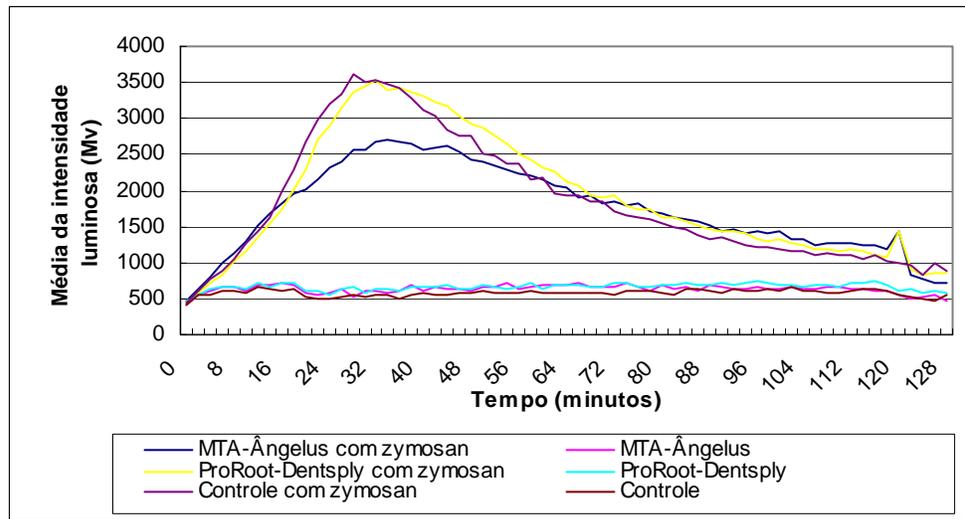


GRÁFICO 16 – Cinética da produção de ROIs por macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), pré-incubados com os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL. O resultado é a média de seis experimentos realizados em duplicata.

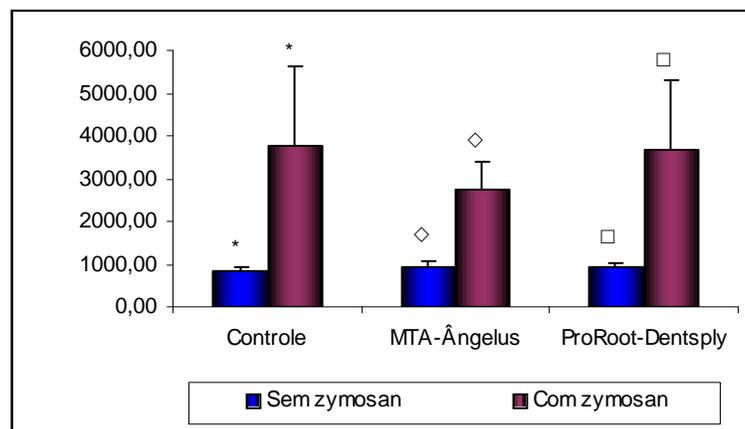


GRÁFICO 17 – Produção de ROIs por macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), pré-incubados com ou sem os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL, no pico de sua produção. O resultado é a média de seis experimentos realizados em duplicata. *, ◇, □ $p < 0,05$ em relação aos grupos com e sem zymosan. T indica o erro padrão.

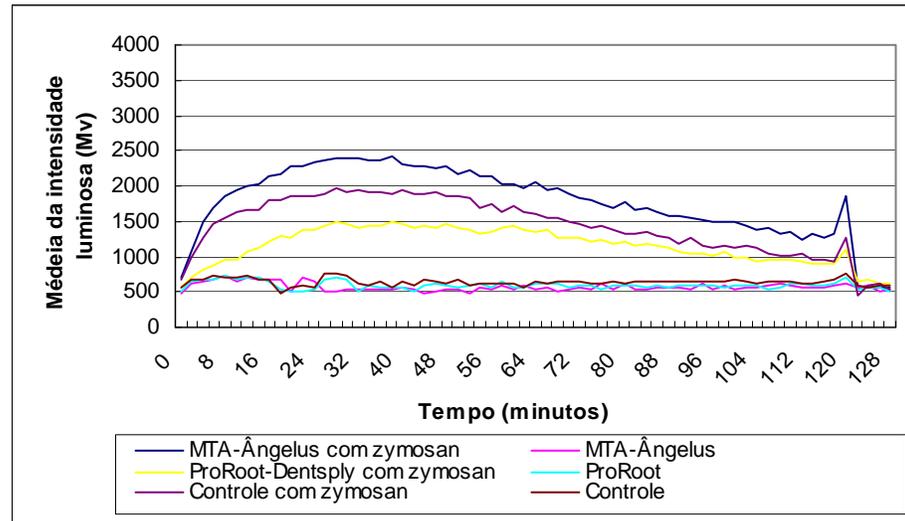


GRÁFICO 18 – Cinética da produção de ROIs por macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), pré-incubados com os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10⁷ partículas de zymosan/mL. O resultado é a média de quatro experimentos realizados em duplicata.

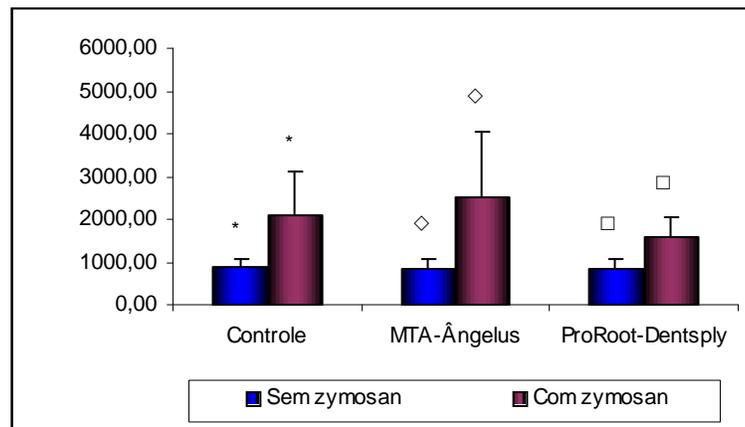


GRÁFICO 19 - Produção de ROIs por macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40^{-/-}), pré-incubados, com ou sem os cimentos por 24h, com e sem estímulo de 10⁷ partículas de zymosan/mL, no pico de sua produção. O resultado é a média de quatro experimentos realizados em duplicata. *, ◇, □ p<0,05 em relação aos grupos com e sem zymosan. T indica o erro padrão.

5.8 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico também é um dos mecanismos de eliminação dos microorganismos fagocitados. É uma forma primária de defesa contra microorganismos intracelulares e patógenos, como fungos e helmintos (Hibbs *et al.*, 1990). Com o objetivo de verificar a produção de NO, na presença do MTA-Ângelus e do ProRoot, utilizaram-se, como estímulos, 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL, inativadas pelo calor com e sem 10U/mL de IFN- γ e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL, inativadas pelo calor, com e sem 10U/mL de IFN- γ . Os resultados estão expressos nos GRÁF. 20 e 21 e TAB. 29 a 31 (localizados no anexo). Com relação ao tipo de macrófago e às diferentes marcas comerciais do MTA, não existe diferença estatística na produção de NO, não ocorrendo, inibição nem indução da sua produção. Com relação aos estímulos bacterianos utilizados, observou-se que, para o M2, não existe diferença entre os grupos com *F. nucleatum* e os capilares e *P. anaerobius* com IFN- γ e os capilares. Para todos os grupos, foram detectadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Para o macrófago M1, com relação aos grupos com e sem presença de antígenos bacterianos ou com e sem presença de IFN- γ , observou-se diferença significativa entre todos eles ($p < 0,05$). A análise estatística do experimento foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, para se verificar o papel do tipo de macrófago na produção de NO; e o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis para verificar o efeito do cimento e dos estímulos utilizados na produção de NO. Esses dois testes foram utilizados também para se verificar a existência ou não de interação entre os três fatores de estudo (o cimento das duas marcas comerciais, o tipo de macrófago e as situações propostas no experimento: presença de bactéria gram-positiva, gram-negativa e de IFN- γ).

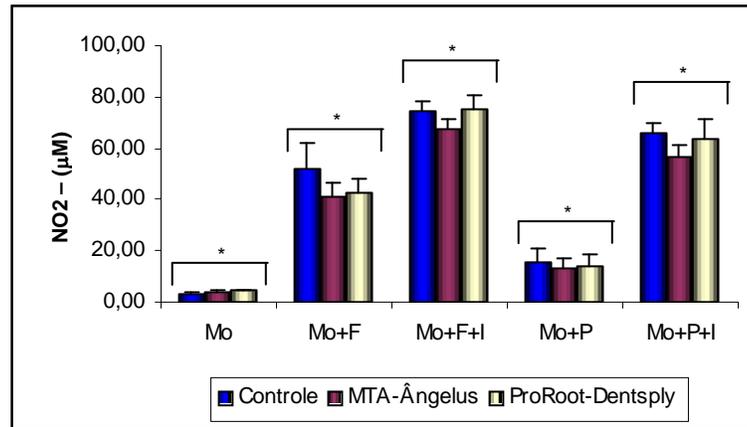


GRÁFICO 20 – Produção de NO_2^- na cultura de macrófagos M1 (camundongos C57BL/6), após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em relação aos grupos com presença das bactérias e IFN- γ . Sensibilidade do teste: $0,05\mu\text{M}$. T indica o erro padrão.

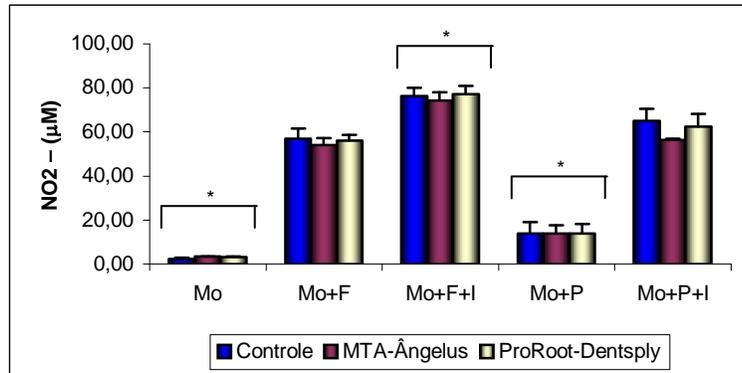


GRÁFICO 21 – Produção de NO_2^- na cultura de macrófagos M2 (camundongos C57BL/6 IL-12p40 $^{-/-}$), após 72h, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos de 10^7 UFC de *F. nucleatum*/mL (F) com 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com 10U/mL de IFN- γ (I). O resultado é a média de cinco experimentos realizados em duplicata. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. Sensibilidade do teste: $0,05\mu\text{M}$. T indica o erro padrão.

6 DISCUSSÃO

O MTA trouxe uma nova perspectiva para a endodontia. Ele foi inicialmente indicado no tratamento de perfurações radiculares e como material retrobturador. Porém, em função do sucesso clínico obtido com a sua utilização, hoje, ele é indicado, também, em capeamentos pulpare, pulpotomias, tratamento de reabsorções, apexificação e apexigênese (Torabinejad *et al.*, 1999; Adamo *et al.*, 1999; Saidon *et al.*, 2003).

O MTA, desenvolvido pelo pesquisador Mohamoud Torabinejad, é um pó cinza que deve ser incorporado à água destilada esterilizada. É composto, basicamente, por óxidos minerais, íons cálcio e fosfato, que também são componentes dos tecidos dentais, fato esse que confere biocompatibilidade ao material (Torabinejad *et al.*, 1995a; Torabinejad *et al.*, 1995d; Fisher, Arens, Milles, 1998; Nakata, Bae, Baumgartner, 1998; Adamo *et al.*, 1999). Esse produto está disponível no mercado, sendo comercializado por duas marca: o ProRoot – Tulsa Dental e o MTA-Ângelus – Odonto-lógika no Brasil.

Como é um material relativamente novo, tem sido alvo de várias pesquisas, *in vivo* e *in vitro*. Os trabalhos demonstraram que o MTA apresenta excelente biocompatibilidade, não provocando inflamação tecidual significativa no local de sua aplicação. Ele permite que os reparos se processem, induzindo a deposição de tecido dentinário, cementário e ósseo (Pitt Ford *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1995a; Pitt Ford *et al.*, 1996; Torabinejad *et al.*, 1997; Torabinejad *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999a; Shabahang *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2001a; Holland *et al.*, 2001b).

Na tentativa de se verificar a biocompatibilidade do MTA, estudos *in vivo* (Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1997; Torabinejad *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999;

Holland *et al.*, 2002a; Holland *et al.*, 2002b; Holland *et al.*, 2002c; Saidon *et al.*, 2003) e *in vitro* (Torabinejad *et al.*, 1995e; Kettering *et al.*, 1995; Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Osório *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; Keiser *et al.* 2000; Abdullah *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003; Haglund *et al.*, 2003; Saidon *et al.*, 2003) foram realizados. Dentre aqueles, o mais freqüente é o teste de implantação do MTA nos interior dos tecidos, o que permite avaliar a reação tissular frente a esses produtos.

Com base nos resultados obtidos, parece que o MTA não interfere na resposta imunológica do organismo. Porém, ainda são poucos os trabalhos a cerca dessa resposta (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Osório *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999; Keiser *et al.* 2000; Zhu *et al.*, 2000; Abdullah *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003; Haglund *et al.*, 2003; Saidon *et al.*, 2003). Esses poucos estudos, porém, relatam que o MTA não inibe a resposta do organismo e indicam o seu uso nas situações propostas pelos fabricantes.

Com a utilização de métodos *in vitro* é possível estudar a citotoxicidade de materiais endodônticos com segurança e reprodutibilidade. Optamos por um estudo *in vitro* em função da nossa célula alvo ser o macrófago e para que não tivéssemos a interferência de outros tipos celulares nos parâmetros analisados.

Apesar do pouco conhecimento disponível sobre a interação do MTA com os mecanismos de resposta do hospedeiro, este dado é de extrema importância uma vez que, em todas as condições clínicas em que esse material é indicado, preconiza-se o seu contato direto com o tecido pulpar, periapical ou periodontal inflamado. Atualmente, sabe-se que, durante o processo inflamatório pulpar, uma gama de células imunocompetentes são atraídas para o local, na tentativa de eliminar o estímulo agressor. Destas células, os macrófagos são uma das primeiras a entrar em contato com corpos estranhos, desempenhando o papel principal na patogênese do processo inflamatório (Van Furth *et al.*, 1972; Unanue, 1978). No que se refere às células mais

prevalentes no infiltrado inflamatório periapical, os estudos se contradizem. Alguns autores acreditam que sejam os linfócitos (Yu & Stashenko, 1987); outros os macrófagos (Stern *et al.*, 1981; Sawashima *et al.*, 1996). Mas, mesmo diante dessa questão, sabe-se que os macrófagos desempenham papel de relevância. Eles atuam nos processos de reconhecimento de antígenos, como também na fagocitose dos mesmos e na tentativa de eliminá-los, além de produzirem várias citocinas que promovem o início, perpetuação, direcionamento e a inibição do processo de resposta imunológica (Stashenko *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000; Metzger, 2000). Em nosso trabalho, essas características influenciaram na decisão de nos ater à resposta dos macrófagos frente ao estímulo do MTA.

Recentes estudos propõem uma nova classificação para os macrófagos: macrófagos M1 e macrófagos M2, de acordo com seu perfil de resposta, de forma semelhante ao que ocorre com os linfócitos T helper (Millis *et al.*, 2000). O estímulo para o macrófago se caracterizar como um macrófago M1, seria a presença da interleucina-12 (Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003). Com base nessa evidência, neste trabalho verificamos a resposta dos dois tipos de macrófagos frente ao estímulo do MTA.

De forma semelhante ao que acontece com os linfócitos Th1, observou-se que os macrófagos M1 possuem maior poder de resposta frente a um antígeno, aumentando a produção de NO e ROIs, na tentativa de eliminação de microorganismos. Por sua vez, os macrófagos M2 produzem TGF- β (Bastos *et al.*, 2002) e promovem a conversão da arginase em ornitina (Millis, 2000), resultando na produção de colágeno e na proliferação celular. Com relação às citocinas produzidas pelos macrófagos M1 e M2 estimulados, Mosser (2003) propôs que não haveria diferença entre as mesmas, com exceção da IL-10 e da IL-12. Assim, o modelo escolhido como macrófago M2 foi aquele proposto por Bastos *et al.* (2002): os macrófagos recuperados de camundongos IL-12p40^{-/-}, uma vez que a subunidade funcional da IL-12 é a p40 (Kobayashi *et*

al., 1989). Esses animais se comportam como duplo knockout, tanto para IL-12 como para IL-23, já que esta última necessita da proteína p40 para que, junto com a p19, forme a IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000).

Apesar do modelo animal utilizado ser duplo knockout, ele não exclui a produção de outras citocinas como a IL-18. A IL-18 é uma citocina estruturalmente homóloga à IL-1, porém, desempenha algumas funções da IL-12. Ela é produzida por macrófagos, quando estimulados com LPS, levando à produção de IFN- γ pelas células natural killer e pelos linfócitos, além de atuar sinergicamente com a IL-12, na indução de uma resposta tipo 1 (Abbas *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2000). Assim, essa citocina, e as demais produzidas pelos macrófagos, na ausência da IL-12, podem ter influenciado em alguns de nossos resultados, como será discutido posteriormente.

Na tentativa de verificar o papel do MTA, após a sua manipulação, o mesmo foi inserido no interior de capilares previamente cortados e esterilizados. Essa metodologia foi escolhida em função dos bons resultados, que obtivemos em trabalho prévio realizado em nosso laboratório (Mendes *et al.*, 2003). Ela permite uma padronização, um contato uniforme e estável do cimento com o macrófago, de maneira semelhante ao que acontece na maioria das indicações clínicas do MTA. O mesmo não ocorre nos trabalhos em que o MTA é inserido diretamente em poços de placa de cultura, com uma área de cimento bem maior do que a realidade clínica. Decidiu-se, também, pela utilização do MTA após sua presa total, na tentativa de maior aproximação das condições clínicas de exposição do material aos macrófagos.

Os capilares, com e sem o MTA, foram colocados diretamente em contato com a suspensão celular de macrófagos M1 e M2. Optamos por um contato direto do material com os macrófagos, em função dos resultados de biocompatibilidade já relatados na literatura: fibroblastos, quando em contato com extratos do MTA (Keiser *et al.*, 2000) e dos osteoblastos (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2000); fibroblastos (Saidon *et*

al., 2003; Haglund *et al.*, 2003) e macrófagos (Haglund *et al.*, 2003), quando em contato direto com o MTA.

Nosso primeiro experimento buscou verificar a viabilidade celular dos macrófagos, após 24 horas de incubação em contato com os cimentos, quando inseridos em tubos de polipropileno. Observou-se que a viabilidade celular foi a mesma para os dois cimentos. Porém, houve diferença na proporção de células vivas de macrófagos M1 e M2: esse número foi maior no grupo do macrófago M1. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de inserção da cultura em tubos de polipropileno, em períodos de tempo menores porque as células competem por espaço dentro do tubo, produzindo várias substâncias e citocinas que podem levar à morte celular. Este método foi utilizado porque os estudos de aderência celular e ROIs também aconteceram em tubos de polipropileno e assim, possíveis efeitos desse fato sobre a atividade dos macrófagos, nestes experimentos, não poderiam ser imputados à menor viabilidade celular.

O segundo estudo, também, teve como objetivo avaliar a viabilidade celular, porém, dessa vez, o ambiente de estudo foram as placas de 24 poços. Os cimentos foram colocados em contato com os macrófagos e incubados por um período de 24, 48 e 72 horas. Verificou-se que a viabilidade celular foi semelhante para os dois cimentos, porém ela foi menor para os macrófagos M1 em contato com o MTA-Ângelus, no tempo de 24h. Em contrapartida, os resultados para o macrófago M1 em contato com o mesmo cimento, no tempo de 48 e 72 horas foram semelhantes aos dos demais grupos. Esses excelentes resultados de viabilidade celular dos macrófagos colocados em contato com o MTA, em ambas as metodologias, coincidem com os relatados no trabalho de Keiser *et al.* (2000), que utilizaram fibroblastos incubados com extratos de MTA a seco; ou nos trabalhos de Mitchell *et al.* (1998), com osteoblastos; de Saidon *et al.* (2003) com fibroblastos, de Koh *et al.* (1997) para osteoblastos em contato direto com o MTA, entre outros autores já mencionados. Porém, Haglund *et al.* (2003) encontraram um número menor de células

e uma morfologia celular caracterizada pela lise dos macrófagos em contato direto com o cimento a fresco. Em contrapartida, os macrófagos que tiveram contato com o MTA, a seco, apresentaram morfologia celular normal, apesar de um número de células inferior ao do grupo controle, porém superior ao do amálgama, IRM[®] e Retroplast[®]. Apesar de, no nosso estudo, utilizarmos apenas o MTA a seco, em alguns locais foi possível a visibilização de algumas áreas de necrose à semelhança do que foi observado por Haglund *et al.* (2003) para o MTA a fresco. O experimento de Haglund *et al.* (2003), até a presente data, é o único que estudou o comportamento de macrófagos em contato com o MTA.

Observou-se queda na viabilidade celular dos macrófagos M2, no período de 72 horas. Tal fato pode ser justificado pela redução de nutrientes no meio, uma vez que o mesmo não foi trocado durante todo o período experimental. O ambiente de estudo, e, os tempos deste experimento foram os mesmos utilizados nos de fagocitose, detecção de TNF, IL-12, IL-10, ROIs e NO. A queda da viabilidade do macrófago M2, no período de 72 horas, pode ter influenciado os resultados dos experimentos de IL-10 e NO, mas, mesmo assim, foram encontradas altas concentrações dessas substâncias.

A técnica utilizada para verificação da viabilidade, em ambos os experimentos, foi a de exclusão do azul de tripan. Ela se baseia na inabilidade da bomba de sódio e potássio das células mortas, que se apresentam azuis ao microscópio, em expulsar o azul de tripan do seu interior. Outras técnicas, como a do ensaio de MTT, que verifica a capacidade da enzima desidrogenase em clivar o sal tetrazólio no corante formazan, já foram utilizadas para verificação da viabilidade celular de fibroblastos em contato direto com o MTA ou com extratos do mesmos; todas apresentaram, também, resultados que comprovam altos índices de viabilidade celular (Osório *et al.*, 1998; Keiser *et al.*, 2000).

O segundo objetivo do nosso estudo foi o de verificar a aderência dos dois tipos de macrófagos frente ao MTA. A aderência e o espraiamento celular têm sido utilizados como critérios para avaliação dos materiais endodônticos (Zhu *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2003), uma vez que a resposta inicial das células frente a estes materiais, pode influenciar no seu crescimento e proliferação. Pela metodologia aplicada, observou-se que os cimentos estudados e os dois tipos de macrófagos não interferiram no processo de aderência celular ao vidro, após 2 horas de incubação. Os resultados do nosso estudo, assemelham-se aos obtidos por Koh *et al.* (1997), Koh *et al.* (1998) e Zhu *et al.* (2000), que observaram a presença de osteoblastos e células MG-63 de osteossarcoma espraiados e aderidos na superfície do MTA. Esses resultados sugerem uma resposta favorável ao MTA e pode ser a chave para justificar a deposição dentinária (Tziafas *et al.*, 2002), cementária (Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1999) e óssea (Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1998; Economides *et al.*, 2003; Saidon *et al.*, 2003), que ocorre após sua aplicação, e que são relatadas na literatura.

A fagocitose é um processo complexo que requer ativação coordenada em resposta a diversos sinais (Underhill *et al.*, 2002). Sabe-se também que a aderência celular é o primeiro passo para a fagocitose, e se isso ocorre de forma adequada, a eficiência do processo fagocítico aumenta (Abbas *et al.*, 2000). Assim, o terceiro experimento realizado teve como objetivo verificar se o MTA interferiria nos processos de aderência e fagocitose. Para tanto, acrescentou-se à suspensão celular, juntamente com os capilares com ou sem cimento, a levedura *S. boulardii*. Após o período de incubação, as lamínulas foram removidas e tratadas com ácido tânico para permitir a diferenciação entre as leveduras fagocitadas e aderidas. A escolha da *S. boulardii* ocorreu em função do seu tamanho, que favorece a contagem e permite maior precisão dos dados. Não foram observadas interferências do cimento e dos tipos de macrófagos no percentual de macrófagos com leveduras aderidas; nem no percentual de macrófagos com leveduras

fagocitadas. Porém, o número de leveduras fagocitadas era maior no grupo dos macrófagos M2. O que está de acordo com os dados encontrados por Bastos *et al.* (2002), após 120 minutos de incubação nos macrófagos M2 com amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Este fato pode ter influenciado nos resultados encontrados nas dosagens de NO, para este tipo de macrófago. No nosso trabalho, o tempo de incubação foi pequeno para avaliarmos se além de uma maior eficiência no processo de fagocitose, este macrófago também apresenta maior eficácia na eliminação da levedura fagocitada.

O processo da fagocitose é de extrema importância na eliminação de microorganismos. Como o MTA é colocado em regiões com possível infecção, é importante que ele não interfira no processo de fagocitose do hospedeiro. Associa-se a isso o fato desse material apresentar propriedades antimicrobianas em função do seu alto pH a fresco (Torabinejad *et al.*, 1995; Estrela *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2003). Assim, mais uma vez, confirmamos resultados positivos no que diz respeito à interação do MTA, com os processos de defesa do organismo.

Outro fator observado em nosso estudo foi a presença de estruturas birrefringentes no interior dos macrófagos, nos grupos onde o cimento estava presente. Essas estruturas seriam partículas do cimento que, possivelmente, foram fagocitadas pelos macrófagos. Porém, novos estudos são necessários para que se confirme este fato.

As citocinas são proteínas envolvidas em quase todas as facetas da imunidade e da inflamação, incluindo imunidade inata, apresentação de antígenos, diferenciação na medula óssea, recrutamento celular e ativação, e expressão de moléculas de adesão (Borish *et al.*, 2003). Além de todas essas funções, as citocinas desenvolvem papel importante na patogênese das lesões periapicais. Atualmente, sabe-se que a inflamação periapical não é somente fruto da ação direta de microorganismos, mas também, de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas (Stashenko *et al.*, 1998). Assim, o quinto, sexto e sétimo objetivos do nosso trabalho foram os de

verificar a possível interferência, no processo de produção de TNF- α , IL-12 e IL-10, dos macrófagos peritoneais M1 e M2, pelo MTA das duas marcas comerciais.

Inicialmente, verificamos se o MTA, por si só, estimulava a produção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10. Anteriormente, alguns trabalhos demonstraram a produção de outras citocinas na presença do MTA, e que osteoblastos e células MG-63 de osteossarcoma produziam maior quantidade de IL-1 α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-11 e GM-CSF, quando na presença deste cimento (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999; Abdullah *et al.*, 2002). Assim, resolvemos verificar a produção de citocinas pelos macrófagos, na presença dos capilares com ou sem os cimentos, além da produção dessas citocinas em várias outras situações experimentais, à semelhança do que ocorre nas lesões periapicais, nas quais temos um ambiente com presença de bactérias anaeróbias (Sundqvist, 1992) e citocinas (Stashenko *et al.*, 1998).

Adicionamos à nossa suspensão celular, antígenos de *F. nucleatum* (ATCC 10953), uma bactéria gram-negativa, antígenos de *P. anaerobius* (ATCC 27337), uma bactéria gram-positiva e o IFN- γ . Essas bactérias foram escolhidas, porque são altamente prevalentes nas infecções de origem endodôntica (Sundqvist, 1992; Lana *et al.*, 2001). Foram utilizadas, em nosso trabalho, em conjunção e não com o IFN- γ . O IFN- γ atua, estimulando a apresentação de antígenos e a produção de citocinas por monócitos, além de ativar as funções efetoras dos monócitos, incluindo aderência, fagocitose, secreção, explosão respiratória e a produção de óxido nítrico (Borish *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram um padrão de produção de citocinas diferente para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Hessle *et al.* (2000) observaram uma produção de IL-12, TNF e IFN- γ aumentada frente a bactérias gram-positivas, enquanto a de IL-10 estava aumentada na presença de bactérias gram-negativas. Uma possível justificativa para tal fato, estaria na

composição da parede celular destas bactérias: as gram-positivas possuem uma grossa camada de peptidoglicano com cadeia de ácido lipoteicóico ligado à membrana citoplasmática, enquanto as bactérias gram-negativas apresentam uma camada mais fina de peptidoglicano e uma camada externa de lipopolissacáride (LPS) (Karlsson *et al.*, 2002). Os resultados obtidos por Hessle *et al.* (2000) são bastante controversos, uma vez que Feezor *et al.* (2003) encontraram concentrações plasmáticas semelhantes de IL-12, TNF, IL-10 tanto para gram-positivos quanto para gram-negativos.

O TNF- α é produzido principalmente por fagócitos mononucleares com o objetivo de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção, e ativar essas células para erradicar microorganismos. Nas lesões apicais, o TNF- α e a IL-1 α , IL-1 β , TNF- β , IL-6 e IL-11 agem na reabsorção óssea, e coletivamente constituem o que conhecemos atualmente como fator de ativação osteoclástica (Stashenko *et al.*, 1990). Em nosso trabalho, foram observadas grandes quantidades de TNF, após incubação de 24 horas. Desse resultado, poder-se-ia extrapolar ser esse o início do processo de resposta, que procura recrutar células e estimular a produção de algumas citocinas, e até ROIs, na tentativa de eliminar o organismo invasor (Garg *et al.*, 2002). Observou-se também a produção de TNF pelos macrófagos, quando em contato com os capilares, o que demonstra que essa citocina é realmente produzida em grande escala frente a estímulos (Abbas *et al.*, 2000; Borish *et al.*, 2003) que, nesse caso, foi representado pelo tioglicolato. Os cimentos não poderiam ser responsabilizados pela produção aumentada de TNF, uma vez que, nos grupos controle (onde as culturas foram estimuladas apenas com os capilares vazios), também se observou tal produção.

Não se verificou diferença na produção de TNF entre os diferentes tipos de macrófagos. Tal resultado corrobora o observado na literatura, que demonstra, em relação à

produção de citocinas, que os macrófagos M2 diferenciam-se dos M1, apenas pela produção de IL-12, IL-10, com as demais citocinas se apresentando de forma semelhante (Mosser, 2003).

Quanto aos dois tipos de cimento estudados, também não foram observadas interferências na produção de TNF, o que é bastante favorável, sugerindo que os mesmos permitem que essa citocina seja produzida e atue nas fases iniciais da resposta imune.

Com relação ao estímulo bacteriano e ao acréscimo de IFN- γ , observou-se diferença na produção de TNF pelos macrófagos M1. Isso foi detectado nos grupos em que as culturas celulares foram estimuladas com os capilares e aqueles estimulados com antígeno de *P. anaeróbios* e IFN- γ , juntamente com os capilares. Também, observou-se um aumento na produção de TNF nos grupos que foram estimulados com IFN- γ em comparação com os estimulados apenas com os antígenos bacterianos. Esse dado, porém, não foi considerado de valor estatístico, para os macrófagos M1. Como já foi mencionado, existem divergências no que diz respeito à produção de citocinas frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (Hessle *et al.*, 2000; Feezor *et al.*, 2003). Contudo, fica claro que houve aumento de TNF na presença de IFN- γ .

A IL-12, nos processos iniciais da infecção, induz a produção por células natural killer e células T de IFN- γ , fato que contribui para a ativação das células fagocíticas, além de favorecer a diferenciação de células Th1, pela maior produção de IFN- γ . Além dessas atuações, ela contribui para a proliferação e diferenciação de células Th1 em resposta aos antígenos, e funciona como um elo entre a resposta inata e a adaptativa antígeno específica (Trinchieri, 1995). Na infecção periapical, a IL-12 atua em todos esses processos descritos, principalmente na diferenciação de células Th1, exacerbando a resposta à infecção microbiana.

Com relação aos cimentos utilizados, observou-se que ambos não induzem a produção de IL-12. Além disso, não se constatou diferença estatística entre os dois tipos de MTA que se comportaram de forma semelhante ao do controle. Assim, pode-se dizer que esses cimentos não interferem nas ações mediadas por essa citocina, o que é favorável durante as respostas a infecções pulpares e periapicais.

Pode-se observar que a produção de IL-12 aumenta tanto na presença das bactérias gram-positivas quanto na das bactérias gram-negativas, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os grupos. A síntese da IL-12 aumenta ainda mais na presença de IFN- γ . Esses dados coincidem com os da literatura: na presença de microorganismos e IFN- γ , ocorre um aumento de IL-12 secretada (Hayes *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1996; Abbas *et al.*, 2000). Neste estudo, utilizou-se o kit de Elisa para IL-12p70 e obtivemos valores muito baixos.

Na tentativa de se verificar a regulação imunomodulatória, analisou-se a produção de IL-10. Esta citocina induz uma homeostase tecidual, levando à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T ativadas e macrófagos (Abbas *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001; Borish *et al.*, 2003). Nas lesões apicais, relata-se que a IL-10 inibe a diferenciação osteoclástica (Stashenko *et al.*, 1998; Kawashima *et al.*, 1999). No nosso trabalho, não encontramos diferença na produção de IL-10 entre os cimentos estudados nem entre estes e o grupo controle.

Nos diferentes tipos de macrófagos, encontrou-se diferença nas concentrações de IL-10, apenas nos grupos estimulados por antígenos de *F. nucleatum*, com a maior produção de IL-10 nos macrófagos de perfil M2. Esses resultados corroboram os achados de Mosser (2003). Ele relata que os macrófagos de perfil M2, quando ativados, promovem maior produção de IL-10 que os macrófagos de perfil M1.

Com relação aos diferentes estímulos utilizados, não se observaram diferenças estatísticas para os macrófagos M1. Para os macrófagos M2, observou-se maior produção de IL-

10, quando os mesmos foram estimulados com *F. nucleatum*. Apesar de não ter apresentado diferença estatística, observou-se que a presença de IFN- γ inibiu a produção de IL-10, em função das ações antagônicas dessas duas citocinas. Outro dado importante: maior produção de IL-10 ocorreu quando os macrófagos, estimulados com os cimentos, foram expostos ao *F. nucleatum*. Esse dado foi o único que coincidiu com os resultados de Karlsson *et al.* (2002), que encontraram maiores níveis de produção de IL-10 frente a bactérias gram-negativas.

Até a presente data, de todos os trabalhos com o MTA, nos quais foram realizadas dosagens de citocinas (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999; Abdullah *et al.* 2002; Haglund *et al.*, 2003), nenhum promoveu dosagem de TNF, IL-12 e IL-10. Assim, nosso estudo é pioneiro nessa informação.

O oitavo objetivo do nosso estudo foi o de verificar a interferência do MTA na produção de ROIs pelos macrófagos M1 e M2. Houve o seguinte procedimento: a suspensão celular pré-incubada, por 24 horas, com os cimentos, foi estimulada com zymosan, acrescida de luminol e encaminhada para leitura. O zymosan foi utilizado por ser o agente de escolha na estimulação da produção de ROIs (Trusk *et al.*, 1978; Azumi *et al.*, 2002). O processo de explosão respiratória, como pode ser visto na cinética de sua produção, tem início após 1 minuto de exposição celular ao antígeno (Carlos *et al.*, 2003) e sua mensuração só é possível graças à adição do luminol, que reage com as espécies oxidantes, produzindo uma luz de comprimento de onda de 425nm, permitindo sua leitura no Lumicount (Trusk *et al.*, 1978).

Observou-se que, no pico de sua produção, não existe diferença, entre os grupos estimulados com os cimentos e o controle, apesar de observarmos diferença no gráfico da cinética de sua produção. O pico de produção de ROIs representa a fase mais importante, uma vez que permite saber se, no seu maior valor produzido, ele permitirá a eliminação dos microorganismos presentes. Desses resultados, podemos inferir que os cimentos não interferem na produção de

ROIs e, por essa via, não inibem a eliminação de possíveis microorganismos que possam estar presentes nas infecções pulpares e periapicais. Por sua vez, o seu alto pH inicial, como descrito anteriormente, também terá um efeito antibacteriano. Os resultados, aqui apresentados, também são pioneiros no que diz respeito à interação do MTA com a produção de ROIs, uma vez que não existem outros relatos na literatura, até a presente data.

Observou-se maior produção de ROIs nos macrófagos de perfil M1, o que se assemelha aos dados da literatura (Mosser, 2003).

Os grupos que foram estimulados com zymosan apresentaram uma produção aumentada de ROIs em comparação aos grupos não estimulados. Isso reflete a condição real dos macrófagos presentes na polpa e periápice, que apresentam concentrações basais baixas de radicais livres, porém, quando estimulados por microorganismos locais, passam a apresentar valores altos, na tentativa de eliminá-los.

Outro radical livre de importância nos processos de defesa contra microorganismos presentes na polpa e no periápice é o óxido nítrico (Márton *et al.*, 2000). Em nosso estudo, observou-se que não existe diferença na produção de NO pelos macrófagos M1 e M2. Esse dado não coincide com os encontrados na literatura, que propõe a subdivisão M1/M2 (Millis *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2002; Mosser, 2003). Porém, nossos resultados podem ser justificados pela possível presença da IL-18. A IL-18 é uma citocina que, sinergicamente à IL-12, induz a produção de IFN- γ e dessa forma, aumenta a produção de NO (Abbas *et al.*, 2000; Joostern *et al.*, 2000; Borish *et al.*, 2003).

Outro dado importante é que IL-10, apesar de inibir as citocinas pró-inflamatórias, parece ser mais eficiente como supressora da produção de TNF pelos macrófagos do que como supressora da síntese de IFN- γ pelas células Th1, uma vez que a concentração de IL-10, que suprime completamente a produção de TNF- α , possui pequeno efeito na liberação de H₂O₂ e um

efeito menor ainda na secreção de radicais intermediários de nitrogênio (Bogdan *et al.*, 1991). Assim, essa concentração de IL-10 pode ter sido suficiente para inibir a produção de ROIs, mas não o suficiente para inibir a produção de NO.

Outro fator de importância para entendermos a equivalência na produção de NO, entre os macrófagos M1 e M2, está nos resultados obtidos nos ensaios da fagocitose da levedura *S. boulardii*. Neste experimento, foi detectado maior número de leveduras no interior dos macrófagos M2 do que no dos macrófagos M1. Dessa forma, se nos experimentos de detecção do NO, também obtivemos maior número de bactérias no interior dos macrófagos M2 do que no dos macrófagos M1, essas seriam incentivo para maior produção de NO na tentativa de eliminá-las. Assim, se seguirmos por essa lógica de pensamento, concluiremos que a produção de NO pelos macrófagos M2 é mais baixa do que a dos M1, uma vez que aqueles precisariam de maior número de bactérias fagocitadas para produzir concentrações de NO equivalentes às mesmas do M1.

A produção de NO foi estimulada pelos antígenos bacterianos, IFN- γ , com diferenças estatisticamente significantes. O aumento na produção de NO detectado, quando os grupos receberam o acréscimo de IFN- γ , está de acordo com os dados na literatura (Abbas *et al.*, 2000; Josten *et al.*, 2000). Nos macrófagos M2, observou-se que, nos grupos estimulados com *F. nucleatum* e IFN- γ , houve a maior produção de NO. O que, também, confirma os dados da literatura, uma vez que os pesquisadores observaram maior produção de NO, na presença de bactérias gram-negativas (Abbas *et al.*, 2000; Josten *et al.*, 2000).

As diferentes marcas de cimento, avaliadas, não foram capazes de induzir alterações na produção de NO. O que novamente confere pontos positivos aos dois materiais, pois o NO tem um papel importante na defesa contra microorganismos além, de exercer uma regulação bifásica

sobre os osteoclastos, estimulando-os quando presentes em baixas concentrações, e inibindo-os quando em grandes quantidades (Ralston *et al.*, 1995).

Os macrófagos M1 e M2, realmente diferem entre si, em muitos aspectos, mas não em todos os aspectos analisados. Acreditamos que o modelo, proposto, de macrófagos M2 deveria ser representado por macrófagos de camundongo knockout para IL-12p40 e para IL-18. Assim, esse animal seria incapaz de sintetizar o IFN- γ e conseqüentemente, de gerar uma resposta tipo 1 (Abbas *et al.*, 2000), o que o levaria a ter um perfil M2 puro.

Este estudo, e todos os outros realizados para verificação da biocompatibilidade do MTA (Koh *et al.*, 1997; Koh *et al.* 1998; Osório *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1999; Keiser *et al.* 2000; Haglund *et al.*, 2003; Saidon *et al.*, 2003) apresentam limitações por se tratarem de estudos, *in vitro*. A síntese de citocinas, *in vivo*, é um evento muito complexo, e sua expressão e efeitos são governados por muitos fatores, incluindo outras células e mediadores. Por sua vez, a expressão de citocinas em experimentos *in vitro* é relativamente fácil de ser mensurada por técnicas modernas, ao passo que o mesmo não pode ser dito para os experimentos *in vivo*, nos quais a fonte de mediadores pode ser indistinta, ou representada por interações complexas, dificultando sua padronização (Mitchell *et al.*, 1999).

De posse dos nossos resultados e dos pertinentes à literatura sobre o assunto, verificamos que pouco se sabe sobre a interação do MTA com os mecanismos de resposta imune do organismo. Assim, espera-se que este trabalho possa ser um incentivo para que novas pesquisas sejam feitas nessa área, pois, muitas questões continuam sem respostas.

7 CONCLUSÃO

Pôde-se observar que:

- Os cimentos ProRoot – Tulsa Dental e MTA-Ângelus – Odonto-lógica não interferiram:
 - na viabilidade e aderência celular;
 - na fagocitose da *S. boulardii*;
 - e na produção de TNF, IL-12, IL-10, ROIs e NO pelos macrófagos, quando estimulados ou não.
- Semelhanças entre os Macrófagos M1 e M2:
 - viabilidade celular em placas de 24 poços;
 - aderência celular;
 - percentual de macrófagos com levedura fagocitada e aderida;
 - produção de TNF e NO.
- Diferenças entre os Macrófagos M1 e M2:
 - os macrófagos M2 sobreviveram menos nos experimentos de viabilidade celular em tubos de polipropileno;
 - os macrófagos M2 apresentaram maior número de leveduras fagocitadas;
 - os macrófagos M2 tiveram maior produção de IL-10 quando estimulados com *F. nucleatum*;

- os macrófagos M2 produziram menos ROIs, quando comparado aos macrófagos M1.

Conclui-se que: os cimentos não inibem a resposta pró-inflamatória dos macrófagos M1 e M2; as respostas desses dois tipos celulares diferenciam-se em alguns aspectos.

SUMMARY

SUMMARY

Mineral trioxide aggregates (MTA) must be biocompatible since they are used as endodontic sealer in regions that are inflamed or infected. In addition, it must not interfere with macrophage activity. Recent studies have divided macrophages into two subtypes, according to their response to stimuli: M1 (activated by the production of IL-12) and M2 (alternatively activated in the absence of IL-12 production). In this study, the effect of two commercial brands of MTA (ProRoot, kind gift from Tulsa Dental, Ballaigues, Switzerland, and MTA-Ângelus, kind gift from Odonto-lógica, Londrina, Brasil) on macrophage activity were tested. Elicited peritoneal macrophages of the M1 (from C57BL/6 mice) and the M2 (from IL-12 gene knockout mice in the C57BL/6 background) were used. Viability, adherence, phagocytosis of *Sacharomyces boulardii*, production of ROIs when stimulated with zymosan, and the production of TNF, IL-12, IL-10 and NO triggered by *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobious* and IFN- γ were determined. The sealers did not interfere with any of the analyzed parameters. However M1 and M2 differed in several aspects: M2 macrophages did not survive as well as M1 in polypropilene tube cultures; ingested higher numbers of yeast cells; produced higher levels of IL-10 when stimulated with *F. nucleatum*; produced lower levels of ROIs. We conclude that the sealers do not inhibit a pro-inflammatory response by M1 or M2 macrophages and that the two types of macrophages respond differently to some stimuli.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; POBER, Jordan S. **Cellular and molecular immunology**. 4ª edição. Pennsylvania: W. B. Saunders company, 2000. 553p.

ABDULLAH, D. *et al.* An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. **Biomaterials**, v.23, p.4001-4010, 2002.

ABEDI, H.R., INGLE, J.I. Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. **J. Calif. Dent. Assoc.**, Loma Linda, v.23, n.12, p.36-39, Dez.1995.

ADAMO, H.L., BURUIANA, R., SCHERTZER, L., BOYLAN, R.J. A comparison of MTA, Super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. **International Endodontics Journal**, New York, v.32, n.3, p.197-203, Mai.1999.

AKAMINE, A. *et al.* Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, v. 10, p. 121-128, 1994.

ALLEN, Lee-Ann H.; ADEREM, Alan. Mechanisms of phagocytosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 36-40, 1996.

ARTESE, Luciano *et al.* Immunoreactivity for interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 17, n. 10, p. 483-481, Out. 1991.

ASTE-AMEZAGA, M. *et al.* Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 5936-5944, 1998.

AZUMI, Kaoru *et al.* Zymosan induces production of superoxide anions by hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 4, p. 567-574, Dez. 2002.

BALTON, Khaled *et al.* A mouse model of inflammatory root resorption induced by pulpal infection. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 93, p. 461-468, 2002.

BABIOR, B. M. The neutrophil NADPH Oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 342-344, Jan. 2002.

BARNES, G. W., LANGELAND, K. Antibody formation in primates following introduction of antigens into the root canal. **Journal Dental Research**, v. 45, p. 1111, 1966 apud KETTERING J. D.; TORABINEJAD, M. Microbiologia e Imunologia. In: CHOEN, S; BURNS, R. C. **Caminhos da polpa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. c. 13, p. 364-377.

BASTOS, Karina R. B. *et al.* Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 271-278, Fev. 2002.

BERGENHOLTZ, G.; NAGAOKA, S.; JONTELL, M. Class II antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. **International Endodontic Journal**, v. 24, p. 8-14, 1991.

BOGDAN, Christian; VODOVOTZ, Yoram; NATHAN, Carl. Macrophage deactivation by interleukin 10. **Journal Exp. Medicine**, v. 174, p. 1549-1555, Dez., 1991.

BORISH, Larry C.; STEINKE, Hohn W. Cytokines and chemokines. **Journal Allergy Clin Immunology**, v. 111, n. 2, p. 460-475, Fev. 2003.

BRENNAN, P. A.; THOMAS, G. J.; LANGDON, J. D. The role of nitric oxide in oral diseases. **Archives of oral Biology**, v. 48, p. 93-100, 2003.

BUSSE, Rudi; MÜLSCH, Alexander. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett.**, v. 275, n. 1,2, p. 87-90, Nov. 1990.

CARLOS, Iracilda Z. *et al.* Influencia de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: FERREIRA, Célia L. L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. 1 Edição. Viçosa, 2003. Cap. 7, p. 135-154.

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.**, v. 186, p. 39-45, 1997.

CUNHA, F. Q.; MONCADA S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 182, n. 3, p. 1155-1159, Fev. 1992.

D' ANDREA, *et al.* Interleukin-10 inhibits human lymphocyte factor/Interleulin-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DE WAAL, M. R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1209, 1991.

DUARTE, Marco Antônio Húngaro; DEMARCHI, Ana cláudia Cardoso de Oliveira; YAMASHITA, José Carlos; KUGA, Milton Carlos, FRAGA, Sylvio de Campos. PH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radol Endod**, v. 95, p. 345-347, 2003.

ECONOMIDES, N. *et al.* Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. **International Endodontic Journal**, v.36, p.44-48, 2002 .

ESTRELA, C., BAMMANN, L. L., ESTRELA, C. R. A., SILVA, R. S., PÉCORÁ, J. D. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and Dycal. **Braz. Dent. J.**, v.11, n.1, p.3-9, Abr.2000.

FANTUZZI, Giamila; REED, David A.; DIANARELLO, Charles A. IL-12 induced IFN- γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 761-767, Set. 1999.

FARACO JÚNIOR, ITALO MEDEIROS. **Histomorphologic evaluation of dog's dental pulp response capped with dentinal adhesive system, calcium hydroxide cement and two types of mineral trioxide aggregate**, 1999. 251p. Dissertação, Doutorado em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

FEEZOR, Robert *et al.* Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5803-5813, Out. 2003.

FIorentino, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 3815, 1991.

FISCHER, E. J., ARENS, D. E., MILLER, C. H. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.24, n.3, p.176-179, Mar.1998.

FORD, T. R., TORABINEJAD, M., MC KENDRY, D. J., HONG, C. U., KARIYAWASAM, S. P. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, London, v.79, n.6, p.756-763, Jun.1995.

GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. **Fundamental immunology**, 3ed. NY: Raven Press Ltda, 1993. p. 1015-1032.

GARG, Amit k.; AGGARWAL, Bharat B. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 509-517, 2002.

GERBER, Jeffrey S.; MOSSER, David M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage FC γ receptors. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 6861-6868, 2001.

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.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, Fev. 1982.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews**, v. 3, p. 23-35, Jan. 2003.

HAGLUND, R. *et al.* Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology radiol endod.**, v.95, n.6, p.739-745, Jun. 2003.

HAHN, Chin-Lo; FALKLER, William A. Antibodies in normal and diseased pulps reactive with microorganisms isolated from deep caries. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 1, p. 28-31, Jan. 1992.

HAHN, Chin-Lo; FALKLER, William A.; SIEGEL, Michael A. A study of T and B cells in pulpal pathosis. **Journal of Endodontics**, v. 15, n. 1, p. 20-26, Jan. 1989.

HAYES, M. P.; MURPHY F. J.; BURD, P. R. Interferon- γ -dependent inducible expression of the human interleukin-12p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. **Blood**, v. 91, p. 4645-4651, 1998.

HESSE, Matthias *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type1/type 2 cytokines *in Vivo*: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolim. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 6533-6544, 2001.

HESSLE, Christina; ANDERSSON, Bengt; WOLD, Agnes 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**, v. 68, n. 6, p. 3581-3586, Jun. 2000.

HOLLAND, Roberto *et al.* Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. **Brazil Dental Journal**, p.109-113, 2001.

HOLLAND, Roberto *et al.* Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or glass ionomer sealer. **Journal of Endodontics**, v.25, n.11, p.728-730, Nov.1999.

HOLLAND, Roberto *et al.* Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. **Brazil Dental journal**, p.23-26, 2002.

HOLLAND, Roberto *et al.* Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, portland cement or calcium hydroxide. **Brazil dental journal**, 2001.

HOLLAND, R., de Souza, V., NERY, M. J., OTOBONI FILHO, J. A., BERNABE, P. F., DEZAN JUNIOR, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v.25, n.3, p.161-166, Mar. 1999.

HOU, Linda; SASAKI, Hajime; STASHENKO, Philip. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4681-4687, Ago. 2000.

JANEWAY, Charles A. *et al.* **Imunobilologia**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2002. 767p.

JOOSTEN, Leo A. B. *et al.* An IFN- γ -independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 6553-6558, 2000.

KARLSSON, Heken; HESSLE, Christina; Rudin. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6688-6696, Dez. 2002.

KAWASHIMA, Nobuyuki *et al.* Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 6, p. 311-316, Jun. 1996.

KAWASHIMA, N.; STASHENKO P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Archives of Oral Biology**, v. 44, p. 55-66, 1999.

KAWASHIMA Nobuyuki *et al.* Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 6, Jun. 1996.

KEISER, Karl; JOHNSON, Chad; TIPTON, David A. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v.26, n.5, p.288-291, Mai. 2000.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Diseases**, v. 7, p. 2-10, 2001.

KENNEDY D. R.; HAMILTON, T. R. Effects on monkeys of introduction of hemolytic streptococci into root canals. **J. Dent. Res.**, v. 36, p. 496, 1957 apud KETTERING J. D.; TORABINEJAD, M. Microbiologia e Imunologia. In: CHOEN, S.; BURNS, R. C. **Caminhos da polpa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. c. 13, p. 364-377.

KETTERING, J.D., TORABINEJAD, M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, v.21, n.11, p.537-539, Nov. 1995.

KOBAYASHI, Michiko *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **Journal Exp. Medicine**, v. 170, p. 827-845, Set. 1989.

KOH, E.T., TORABINEJAD, M., PITT FORD, T.R., BRADY, K., MC DONALD, F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J. Biomed. Mater. Res.**, London, v.37, n.3, p.432-439, Dez. 1997.

KOH, E.T., MC DONALD, F., PITT FORD, T.R., TORABINEJAD, M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.24, n.8, Aug. 1998.

LANA, M. A. *et al.* Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 100-105, 2001.

LEE, S. J., MONSEF, M., TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, v.19, n.11, p.541-544, Nov. 1993.

MA, X. *et al.* The interleukin-12p40 gene promoter is primed by interferon- γ in monocytic cells. **J. Exp. Medicine**, v. 183, p. 147-157, 1996.

MA, X.; NEURATH, M.; TRINCHIERI, G. Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12p40 gene promoter. **L. Bio. Chem.**, v. 272, p. 10389-10395, 1997.

MACMICKING, John; XIE, Qiao-Wen; NATHAN, Carl. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MAGRAM, J.; CONNAUGHTON, S. E.; WARRIER, R. R.; CARVAJAL, D. M.; WU, C. Y.; FERRANTE, J.; STEWART, C.; SARMIENTO, U.; FAHERTY, D. A.; GATELY, M. K. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. **Immunity**, v. 4, p. 471-481, 1996.

MAK, Tak; PENNINGER, Josef M.; OSASHI, Pamela S. Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. **Nature Reviews**, v. 1, p. 11-19, Out. 2001.

MARTON, I. J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiology and immunology**, v. 15, p. 139-150, 2000.

MATSUO, Takashi *et al.* Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 10, p. 497-500, Oct. 1992.

MATTNER, F. *et al.* Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1553-1559, 1996.

MERBERG, D. M.; WOLF, S. F. & CLARK, S. C. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. **Immunol. Today**, v. 13, p. 77-78, 1992.

MENDES, Sônia *et al.* *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95-99, Fev. 2003.

METZGER Z. Macrophages in periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, v. 16, p. 1-8, 2000.

MITCHELL, P. J., PITT FORD, T. R., TORABINEJAD, M., MC DONALD, F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, London, v.20, n.2, p.167-173, Jan. 1999.

MILIIS, Charles D. *et al.* Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 6166-6173, 2000.

MONTOVANI, Alberto *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov. 2002.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. **Adv. Immunol.**, v. 56, p. 1, 1994.

MOSSER, David M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 73, p. 209-212, Fev. 2003.

NAKAMURA, Shuji *et al.* IFN- γ -dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3330-3336, 2000.

NAKATA, T. T., BAE, K. S., BAUMGARTNER, J. C. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. **Journal of Endodontics**, v.24, n.3, p.184-186, Mar. 1998.

NATHAN, Carl; SHILOH, Michael. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Colloquium**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, Ago. 2000.

NOBUYUKI, Tani-Ishii *et al.* Effect of T-cell deficiency on the formation of periapical lesions in mice: histological comparison between periapical lesion formation in BALB/c and BALB/c *nu/nu* mice. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 4, p. 195-199, Abr. 1995.

OKIJI, Takashi *et al.* Distribution of Ia Antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. **Journal of Endodontics**, v. 20, n. 1, p. 27-31, Jan. 1994.

OPPMANN, Birgit *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, p. 715-725, Nov. 2000.

OSORIO, R.M., HEFTI, A., VERTUCCI, F.J., SHAWLEY, A.L. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v.24, n.2, p.91-96, Fev. 1998.

PAGE D. O.; TRUMP G. N.; SCHAEFFER L. D. Pulpal studies. I. Passage of ^3H tetracycline into circulatory system through rat molar pulps. **Oral Sug.**, v. 35, p. 555, 1973 apud KETTERING J. D.; TORABINEJAD, M. Microbiologia e Imunologia. In: CHOEN, S.; BURNS, R. C. **Caminhos da polpa**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. c. 13, p. 364-377.

PEARSON, Alan M. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 20-28, 1996.

PEREIRA, Fausto E. L.; BOGLIOLO, Luigi. Inflamações. In: FILHO, Geraldo B. *et al.* **Bogliolo Patologia**. 5^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1994. c. 7, p. 111-143.

PEREZ, A. L. *et al.* Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact whit Pro-Root[®] MTA and white MTA. **International Endodontic Journal**, v.36, p.567-570, 2003.

PITT FORD, Thomas R. *et al.* Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, v.79, n. 6, p.756-763, Jun.1995.

PITT FORD, Thomas R. *et al.* Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **Jada**, v.127, p.1491-1494, Out.1996.

PULVER W. H.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. Immune components in normal and inflamed human dental pulp. **Archs Oral Biol.**, v. 22, p. 103-111, 1977.

RALSTON, S. H. *et al.* Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, p. 1040-1049, 1995.

RIBEIRO SOBRINHO, Antônio Paulino *et al.* Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, p. 344-353, 2002.

ROGGE, Lars *et al.* Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **Journal of Exp. Medicine**, v. 186, n. 5, p. 825-831, Mar. 1997.

SÁ, Alessandra Rosa de *et al.* Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin α in dental granulomas. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v. 96, p. 356-360, 2003.

SAIDON, Jacob *et al.* Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology radiol endod.**, p.483-489, Abr. 2003.

SASAKI, Hajime *et al.* IL-10, but not IL-4, supresses infection-stimulated bone resortpion *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 3626-3630, 2000.

SCHWARTZ, R.S., MAUGER, M., CLEMENT, D.J., WALKER, W.A. 3RD. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, Alaska, v.130, n.7, p.967-975, Jul. 1999.

SELVERSTONE, Joan S. *et al.* The dark side of dioxigen biochemistry. **Current Opinion in chemical Biology**, v. 2, p. 253-262, 1998.

SHABAHANG, S.; TORABINEJAD, M.; BOYNE, P.P.; ABEDI, H.; MC MILLAN, P. A. comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. **Journal of Endodontics**, v.25, n.1, p.1-5, Jan.1999.

SHAFER, William G.; HINE, Maynard K.; LEVY, Barnet M. Doenças da polpa e dos tecidos periapicais. In: _____. **Tratado de Patologia Bucal**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1987. c. 8, p. 443-471.

SIQUEIRA JÚNIOR, José Freias; DANTAS, Carlos José Saboia. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora médica científica Ltda, 2000, 238p.

SLUYK, S. R.; MOON, P. C.; HARTWELL, G. R. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. **Journal of Endodontics**, v.26, n.11, p.768-771, Nov.1998.

SPEER M. L.; MADONIA J. V.; HEUER, M. A. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 3, p. 418-423, 1977.

STASHENKO, P. The role of immune cytokines in pathogenesis of periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, v. 6, p. 89-96, 1990.

STASHENKO, P. *et al.* Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg, Oral Med, Oral Path**, v. 78, p. 494-502, 1994.

STASHENKO, P.; SOUZA, R. D. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

STASHENKO, P.; YU, S. M. T helper an T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 5, p. 830-834, Mai. 1989.

STERN, Michael H. *et al.* Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 3, p. 117-122, Mar. 1981.

STITES, Daniel P.; TERR, Abba I. **Imunologia básica**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1992, 187p.

SUZUKI, N.; OKIJI, T.; SUDA, H. Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. **Archives of Oral Biology**, v. 44, p. 67-79, 1999.

SUZUKI, Takahiro *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 31, p. 488-493, 2002.

TAKEICHI, O. *et al.* Inducible nitric oxide synthase activity by interferon- γ -producing cells in human radicular cysts. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 124-130, 1999.

TORABINEJAD, M., CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.25, n.3, p.197-205, Mar. 1999.

TORABINEJAD, M.; EBY W. C.; NAIDORF, L. J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 11, p. 479, 1985 apud KETTERING J. D.; TORABINEJAD, M. Microbiologia e Imunologia. In: CHOEN, S.; BURNS, R. C. **Caminhos da polpa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. c. 13, p. 364-377.

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.21, n.3, p.109-112, Mar. 1995.

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Dye leakage of four root end filling materials effects of blood contamination. **Journal of Endodontics**, v.20, n.4, p.159-163, Abr. 1994.

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Tissue reaction to implanted Super-EBA® and mineral trioxide aggregate in the mandible of Guinea pigs: a preliminary report. **Journal of Endodontics**, v.12, n.11, p.565-571, Nov. 1995.

TORABINEJAD, M., FORD, T. R., ABEDI, H. R., KARIYAWASAM, S. P., SABOR, H. M. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of Guinea pigs. **Jornal of Endodontics**, v.24, n.7, p.468-471, Jul. 1998.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MC DONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.21, n.7, p.349-353, Jul. 1995.

TORABINEJAD, M., HONG, C.U., LEE, S.J., MONSEF, M., PITT FORD, T.R. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. **Journal of Endodontics**, v.21, n.12, p.603-608, Dez. 1995.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; PITT FORD, T.R.; KAIYAWASAM, S.P. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of Guinea pigs: a preliminary report. **Jornal of Endodontics**, v.21, n.11, p.569-571, Nov. 1995.

TORABINEJAD, M., HONG, C. U., PITT FORD, T. R., KETTERING, J. D. Antibacterial effects of some root end filling materials. **Journal of Endodontics**, v.21, n.8, p.403-406, Aug. 1995.

TORABINEJAD, M., HONG, C.U., PITT FORD, T.R., KETTERING, J.D. Cytotoxicity of four root end filling materials. **Journal of Endodontics**, v.21, n.10, p.489-492, Out. 1995.

TORABINEJAD, M., PITT FORD, T. R., MC KENDRY, D. J., ABEDI, H. R., MOLEIRO, D. A., KARIYAWASAM, S. P. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **Journal of Endodontics**, v.23, n.4, p.225-228, Abr. 1997.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 19, n.12, p.591-595, Dez. 1993.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 251-76, 1995.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews**, vol. 3, p. 133-146, Fev. 2003.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING R. C. **Inflamação – Uma revisão do Processo**. 6ed. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 172p., 1996.

TRUSH, Michael A.; WILSON, Mark E.; DYKE, Knox Van. The generation of chemiluminescence by phagocytic cells. In: COLOWICK, Sidney P.; KAPLAN, Nathan O. **Methods in enzymology**. 1ª edição. Londres; Academic Press, 1978. v. LVII, cap. 39, p. 462-493.

TZIAFAS, D. *et al.* The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 245-254, 2002 .

UNANUE, E. The regulation of lymphocyte functions by macrophage. **Immunology Reviews**, v. 40, p. 228-235, 1978.

UNDERHILL, David M.; OZINSKY, Adrian. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 825-852, 2002.

VAN FURTH, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull WHO**, v. 46, p. 845-853, 1972.

VODOVOTZ, Yoram *et al.* Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN- γ and bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 4110, 1994.

WALLSTROM John B. *et al.* Role of T cells in the pathogenesis of periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 76, p. 213-218, 1993.

WARFVINGE, J; DAHLEN, G.; BERGENHOLTZ, G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. **Journal of Dental Research**, v. 64, n. 8, p. 1046-1050, Ago. 1985.

WANG C. Y.; STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. **Journal of Dental Research**, v. 70, n. 10, p. 1362-1366, Out. 1991.

WILLEMS, F. *et al.* Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. **Eur J. Immunol.**, v. 24, p. 1007, 1994.

YUN, Peter L. *et al.* Hydrolysis of interleukin-12 by porphyromonas gingivalis major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5650-5660, Set. 2001.

YU, Siu Min; STASHENKO, Philip. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 13, n. 11, p. 535-540, Nov. 1987.

ZHU, Qiang *et al.* Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 7, p. 404-406, Jul. 2000.

ANEXOS

TABELA 1 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 viáveis, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas					
Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	0,95	0,02	0,93	0,97	0,021
MTA- Ângelus	0,90	0,08	0,80	0,96	0,089
ProRoot	0,95	0,02	0,92	0,97	0,021

TABELA 2 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 viáveis, após 24 horas de incubação em tubos de polipropileno, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas					
Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	0,81	0,16	0,61	0,96	0,198
MTA- Ângelus	0,86	0,09	0,77	0,96	0,105
ProRoot	0,85	0,12	0,69	0,96	0,141

TABELA 3 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 viáveis, após 24h de exposição ao MTA das duas marcas comerciais.

Fonte de Variação	Valor p
Cimento	0,869
Macrófago	0,031
Cimento*Macrófago	0,584

*Interação entre os dois fatores.

TABELA 4 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 viáveis, após 24, 48 e 72 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas						
Cimento	Tempo	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	24 horas	0,995	0,008	0,98	1,00	0,008
	48 horas	0,993	0,006	0,98	1,00	0,006
	72 horas	0,991	0,011	0,97	1,00	0,011
MTA- Ângelus	24 horas	0,988	0,006	0,98	1,00	0,006
	48 horas	0,988	0,011	0,97	1,00	0,011
	72 horas	0,986	0,014	0,97	1,00	0,014
ProRoot	24 horas	0,991	0,009	0,98	1,00	0,009
	48 horas	0,989	0,011	0,98	1,00	0,011
	72 horas	0,991	0,008	0,98	1,00	0,008

TABELA 5 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 viáveis, após 24, 48 e 72 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas						
Cimento	Tempo	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	24 horas	0,998	0,004	0,99	1,00	0,004
	48 horas	0,998	0,005	0,99	1,00	0,005
	72 horas	0,986	0,011	0,97	1,00	0,011
MTA- Ângelus	24 horas	0,999	0,002	0,99	1,00	0,002
	48 horas	0,997	0,005	0,99	1,00	0,005
	72 horas	0,982	0,010	0,96	0,99	0,010
ProRoot	24 horas	0,997	0,005	0,99	1,00	0,005
	48 horas	0,995	0,007	0,98	1,00	0,007
	72 horas	0,979	0,021	0,95	1,00	0,022

TABELA 6 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 viáveis, após 24, 48 e 72h de exposição ao MTA das duas marcas comerciais.

Efeito	Nível	Valor p
Global do tipo de macrófago	-	0,020
Global do tipo de cimento	-	0,257
Global do tempo	-	0,000
Do tempo	M1	0,812
	M2	0,000
Do tipo de cimento (24 horas)	M1	0,212
	M2	0,403
Do tipo de cimento (48 horas)	M1	0,863
	M2	0,807
Do tipo de cimento (72 horas)	M1	0,793
	M2	0,792
Do tipo de macrófago (24 horas)	Cimento controle	0,662
	Cimento MTA-A	0,003
	Cimento MTA-P	0,228
Do tipo de macrófago (48 horas)	Cimento controle	0,142
	Cimento MTA-A	0,081
	Cimento MTA-P	0,142
Do tipo de macrófago (72 horas)	Cimento controle	0,414
	Cimento MTA-A	0,662
	Cimento MTA-P	0,491

TABELA 7 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M1 aderidas, após 2 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas					
Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	0,609	0,155	0,43	0,85	0,255
MTA- Ângelus	0,651	0,147	0,42	0,86	0,226
ProRoot	0,650	0,142	0,49	0,89	0,219

TABELA 8 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de células M2 aderidas, após 2 horas de incubação, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas					
Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	0,638	0,080	0,54	0,78	0,125
MTA-Ângelus	0,623	0,101	0,42	0,75	0,162
ProRoot	0,669	0,071	0,51	0,77	0,106

TABELA 9 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 aderentes, após exposição ao MTA das duas marcas comerciais.

Fonte de variação	Nível	Valor p
Global do tipo do macrófago	-	0,626
Global do tipo de cimento	-	0,685
Do cimento	Macrófago M1	0,651
	Macrófago M2	0,519
	Controle	0,436
Do tipo de macrófago	Cimento MTA-Ângelus	0,684
	Cimento ProRoot	0,631

TABELA 10 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de macrófagos M1, com leveduras fagocitadas, leveduras aderidas, e o número de leveduras fagocitadas/número de células, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas						
Respostas	Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
% Macrófago com levedura fagocitada	Controle	78,57	14,69	51,46	94,20	0,187
	MTA- Ângelus	85,04	17,35	42,65	98,04	0,204
	ProRoot	87,67	13,04	55,61	99,51	0,149
% Macrófago com levedura aderida	Controle	41,30	14,92	15,28	68,72	0,184
	MTA- Ângelus	40,17	19,49	10,45	77,94	0,485
	ProRoot	41,62	14,50	21,95	76,39	0,348
Nº de leveduras fagocitadas /Nº de células	Controle	5,53	2,30	1,84	8,61	0,416
	MTA- Ângelus	6,33	2,59	1,17	8,60	0,409
	ProRoot	6,46	2,76	1,95	9,79	0,427

TABELA 11 – Medidas descritivas dos experimentos em relação ao percentual de macrófagos M2 com leveduras fagocitadas, com leveduras aderidas, e o número de leveduras fagocitadas/número de células, após 1 hora de incubação com *S. boulardii*, na presença dos capilares com ou sem MTA das duas marcas comerciais.

Medidas descritivas						
Respostas	Cimento	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
% de macrófago com levedura fagocitada	Controle	87,32	9,99	69,50	98,07	0,114
	MTA-Ângelus	89,63	7,96	77,11	99,04	0,089
	ProRoot	90,86	6,78	81,16	99,52	0,075
% de macrófago com levedura aderida	Controle	40,77	10,03	26,57	58,17	0,246
	MTA-Ângelus	48,28	19,60	22,39	75,50	0,406
	ProRoot	51,25	26,55	16,92	98,56	0,518
Nº de leveduras fagocitadas /Nº de células	Controle	7,28	2,80	2,45	10,56	0,385
	MTA-Ângelus	7,95	3,61	3,13	13,26	0,454
	ProRoot	8,03	3,76	3,06	13,35	0,468

TABELA 12 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 com leveduras fagocitadas.

Fonte de variação	Nível	Valor p
Global do tipo do macrófago	-	0,217
Global do tipo de cimento	-	0,215
Do cimento	Macrófago M1	0,144
	Macrófago M2	0,784
	Controle	0,123
Do tipo de macrófago	Cimento MTA-Ângelus	0,796
	Cimento ProRoot	0,796

TABELA 13 – Resultados da análise estatística para o percentual de macrófagos M1 e M2 com leveduras aderidas.

Fonte de Variação	Valor p
Cimento	0,645
Macrófago	0,229
Macrófago * Cimento	0,640
* Interação entre os dois fatores	

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

Fonte de Variação	Valor p
Cimento	0,636
Macrófago	0,039
Macrófago * Cimento	0,995
* Interação entre os dois fatores.	

TABELA 15 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	376,82	265,92	82,10	598,78	0,706
	Mo + F	1422,71	1152,00	93,12	2122,92	0,810
	Mo + F + I	1877,60	1628,24	92,32	3280,88	0,867
	Mo + P	563,09	259,90	341,29	849,07	0,462
	Mo + P + I	666,85	38,73	623,65	698,45	0,058
MTA-A	Mo	331,52	213,27	85,26	456,77	0,643
	Mo + F	908,47	961,73	97,01	1970,76	0,852
	Mo + F + I	2038,01	1736,34	108,34	3474,19	0,852
	Mo + P	700,70	267,98	544,66	1010,13	0,382
MTA-P	Mo + P + I	758,98	85,28	709,61	857,46	0,112
	Mo	381,99	258,62	95,04	597,07	0,677
	Mo + F	881,27	1022,83	107,36	2040,87	1,160
	Mo + F + I	2105,07	1759,41	96,38	3372,84	0,836
	Mo + P	627,62	371,47	334,99	1045,53	0,592
	Mo + P + I	665,27	37,99	622,38	694,70	0,057

TABELA 16 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de TNF por macrófagos M2, após 24h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	424,16	156,93	284,18	593,81	0,370
	Mo + F	950,99	781,72	307,36	1820,88	0,822
	Mo + F + I	2832,65	1634,48	949,24	3879,85	0,577
	Mo + P	422,82	118,19	293,95	526,14	0,280
	Mo + P + I	1188,63	630,26	780,86	1914,55	0,530
MTA-A	Mo	445,58	101,72	358,69	557,47	0,228
	Mo + F	1164,71	1039,19	412,86	2350,55	0,892
	Mo + F + I	3126,83	2010,04	929,82	4873,50	0,643
	Mo + P	550,99	85,82	464,21	635,80	0,156
	Mo + P + I	1135,87	467,99	670,82	1606,75	0,412
MTA-P	Mo	458,02	72,04	386,86	530,91	0,157
	Mo + F	1237,67	1038,28	551,75	2432,19	0,839
	Mo + F + I	2855,10	1604,24	1015,53	3963,50	0,562
	Mo + P	466,53	149,69	296,10	576,68	0,321
	Mo + P + I	934,65	395,08	665,59	1388,23	0,423

TABELA 17 – Resultados da análise estatística para a produção de TNF de macrófagos M1 e M2 incubados com os cimentos das duas marcas comerciais, com e sem a presença das bactérias gram-positivas e gram-negativas, acrescidas e não de IFN- γ .

Efeito	Nível	Valor p
Global do tipo de macrófago	-	0,198
Global do tipo de cimento	-	0,916
Global do meio	-	0,000
Do cimento	Mo	0,849
	Mo + F	0,994
	Mo + F + I	0,960
	Mo + P	0,220
	Mo + P + I	0,423
	Mo	0,875
	Mo + F	0,733
Do cimento – M1	Mo + F + I	0,733
	Mo + P	0,561
	Mo + P + I	0,066
	Mo	0,957
	Mo + F	0,733
Do cimento – M2	Mo + F + I	0,957
	Mo + P	0,252
	Mo + P + I	0,561
	M1	0,028
Do meio	M2	0,000
	Cimento controle	0,493
Do meio – M1	Cimento MTA-A	0,291
	Cimento MTA-P	0,530
	Cimento controle	0,045
Do meio – M2	Cimento MTA-A	0,064
	Cimento MTA-P	0,029

TABELA 18 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-12p70 por macrófagos M1, após 24h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com ou sem 10U de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Estímulo	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	28,02	-	28,02	28,02	-
	Mo + F + I	63,28	27,21	24,29	93,04	0,430
	Mo + P	52,31	-	52,31	52,31	-
	Mo + P + I	59,55	24,43	42,28	76,82	0,410
MTA- Ängelus	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	72,81	-	72,81	72,81	-
	Mo + F + I	51,55	23,87	24,85	70,81	0,463
	Mo + P	54,98	19,94	40,88	69,07	0,363
ProRoot	Mo + P + I	55,14	17,24	42,51	74,78	0,313
	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	*	-	*	*	-
	Mo + F + I	71,88	0,70	71,38	72,37	0,010
	Mo + P	*	-	*	*	-
	Mo + P + I	63,93	-	63,93	93,93	-

* valores abaixo do nível de detecção.

TABELA 19 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-12p70 de macrófagos (Mo) M1 incubados por 24h, com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem a presença da bactéria *F. nucleatum* com e sem IFN- γ recombinante e da bactéria *P. anaerobius* também com e sem IFN- γ .

Fonte de variação	Nível	Valor p
Global do tipo de cimento	-	0,664
Global dos estímulos utilizados	-	0,817
Dos estímulos utilizados	Controle	0,712
	MTA-Ängelus	0,639
	ProRoot	0,221
	Mo+Fuso	0,317
Do cimento	Mo+Fuso+IFN	0,453
	Mo+Pepto	1,000
	Mo+Pepto+IFN	0,953

TABELA 20 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de IL-10 por macrófagos M1, após 72h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	186,04	82,60	92,75	249,86	0,444
	Mo + F + I	129,51	127,83	39,12	219,90	0,987
	Mo + P	142,36	-	142,36	142,36	-
	Mo + P + I	85,12	-	85,12	85,12	-
MTA- Ângelus	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	276,23	84,11	191,75	359,95	0,305
	Mo + F + I	152,12	139,73	53,42	312,01	0,919
	Mo + P	128,21	-	128,21	128,21	-
	Mo + P + I	75,91	105,51	1,30	150,51	1,390
ProRoot	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	196,51	79,37	113,00	270,96	0,404
	Mo + F + I	82,48	75,39	28,64	168,64	0,914
	Mo + P	54,38	38,88	26,89	81,87	0,715
	Mo + P + I	103,85	-	103,85	103,85	-

*valores abaixo do nível de detecção.

TABELA 21 – 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	281,33	23,69	254,06	296,87	0,084
	Mo + F + I	88,95	57,40	48,70	154,68	0,645
	Mo + P	104,09	108,59	27,30	180,87	1,043
	Mo + P + I	63,92	3,28	61,60	66,24	0,051
MTA- Ângelus	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	470,73	66,39	395,88	522,53	0,141
	Mo + F + I	175,89	77,00	115,13	262,49	0,438
	Mo + P	116,69	109,50	39,26	194,12	0,938
	Mo + P + I	68,23	61,81	24,52	111,94	0,906
ProRoot	Mo	*	-	*	*	-
	Mo + F	433,33	16,76	414,30	445,92	0,039
	Mo + F + I	187,06	107,05	94,50	304,28	0,572
	Mo + P	144,88	133,80	50,27	239,49	0,924
	Mo + P + I	155,87	-	155,87	155,87	-

*valores abaixo do nível de detecção.

TABELA 22 – Resultados da análise estatística para a produção de IL-10 de macrófagos M1 e M2 incubados por 72h, com os cimentos das duas marcas comerciais e na ausência e presença da bactéria *F. nucleatum* com e sem IFN- γ recombinante e da bactéria *P. anaerobius* também com e sem IFN- γ .

Fonte de Variação	Valor p
Macrófago	0,017
Cimento	0,265
Dos estímulos utilizados	0,000
Macrófago * Cimento	0,063
Macrófago * estímulos utilizados	0,016
Cimento * estímulos utilizados	0,390

* Interação entre os dois fatores.

TABELA 23 – Medidas descritivas dos picos de produção de ROIs pelos macrófagos M1 pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos das duas marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL.

Medidas descritivas						
Cimento	Estímulo	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Sem zymosan	831,48	272,43	629,38	1369,25	0,328
	Com zymosan	3778,49	4544,99	1268,25	13008,50	1,203
MTA-Ângelus	Sem zymosan	929,75	337,00	598,75	1450,50	0,363
	Com zymosan	2757,69	1599,32	1513,86	5467,00	0,580
ProRoot	Sem zymosan	911,33	267,44	635,75	1328,25	0,294
	Com zymosan	3695,67	3896,72	1345,50	11545,00	1,054

TABELA 24 – Medidas descritivas dos picos de produção de ROIs pelos macrófagos M2 pré-incubados com os capilares, com ou sem os cimentos das duas marcas comerciais por 24h, com e sem estímulo de 10^7 partículas de zymosan/mL.

Medidas descritivas						
Cimento	Estímulo	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Sem zymosan	894,85	382,74	631,33	1460,25	0,428
	Com zymosan	2085,52	2047,35	881,33	5147,75	0,982
MTA-Ângelus	Sem zymosan	855,56	401,92	624,50	1457,25	0,470
	Com zymosan	2512,13	3056,31	853,00	7093,50	1,217
ProRoot	Sem zymosan	831,34	459,64	568,00	1519,50	0,553
	Com zymosan	1593,81	880,43	1068,00	2906,75	0,552

TABELA 25 – Resultados da análise estatística da produção de ROIs de macrófagos M1 e M2 pré-incubados com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem estímulo do zymosan, no pico de sua produção.

Fonte de Variação	Valor p
Macrófago	0,020
Cimento	1,000
Estímulo com zymosan	0,000
Cimento * Macrófago	0,790
Macrófago * Estímulo com zymosan	0,257
Cimento * Estímulo com zymosan	0,950

* Interação entre os dois fatores.

TABELA 26 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M1, após 72h de incubação, na ausência ou presença dos cimentos das duas marcas comerciais, acrescidos e não de 10^7 *F. nucleatum*/mL (F) com e sem 10U/mL de IFN- γ recombinante (I) e 10^7 *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U/mL de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	3,21	1,16	2,25	5,12	0,361
	Mo + F	52,27	22,12	25,20	79,16	0,423
	Mo + F + I	74,66	8,76	70,01	90,31	0,117
	Mo + P	15,65	12,38	3,95	33,89	0,791
	Mo + P + I	65,93	8,52	56,61	77,85	0,129
MTA-Ângelus	Mo	3,66	2,13	2,12	7,20	0,582
	Mo + F	41,37	10,64	30,42	56,78	0,257
	Mo + F + I	67,20	9,82	52,12	79,58	0,146
	Mo + P	12,87	9,65	3,96	27,66	0,750
	Mo + P + I	56,78	10,81	44,41	65,93	0,190
ProRoot	Mo	4,34	0,66	3,36	5,23	0,152
	Mo + F	42,75	12,72	29,21	60,83	0,298
	Mo + F + I	75,54	11,45	57,87	86,45	0,151
	Mo + P	13,58	11,25	3,68	30,94	0,828
	Mo + P + I	63,76	16,28	43,96	78,19	0,255

TABELA 27 – Medidas descritivas dos experimentos em relação à produção de NO por macrófagos M2, após 72h de incubação, na ausência ou 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- γ recombinante (I) e 10^7 UFC de *P. anaerobius*/mL (P) também com e sem 10U/mL de IFN- γ (I).

Medidas descritivas						
Cimento	Meio	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
Controle	Mo	2,41	1,01	1,30	4,04	0,419
	Mo + F	57,04	9,91	42,55	70,47	0,174
	Mo + F + I	76,26	8,23	68,80	89,09	0,108
	Mo + P	13,91	11,58	1,74	28,37	0,832
	Mo + P + I	65,08	12,40	52,54	80,52	0,191
MTA- Ângelus	Mo	3,35	0,46	2,74	3,99	0,137
	Mo + F	54,12	7,18	45,64	63,15	0,133
	Mo + F + I	74,38	7,91	67,55	87,59	0,106
	Mo + P	13,86	8,20	4,07	23,81	0,592
	Mo + P + I	56,27	1,77	43,76	71,99	0,032
ProRoot	Mo	3,10	0,94	1,93	4,32	0,303
	Mo + F	56,14	5,67	49,26	63,53	0,101
	Mo + F + I	77,23	8,11	70,53	90,23	0,105
	Mo + P	13,92	9,73	3,52	26,39	0,699
	Mo + P + I	62,42	12,73	47,46	79,03	0,204

TABELA 28 – Resultados da análise estatística para a produção de NO de macrófagos M1 e M2 incubados com os cimentos das duas marcas comerciais e com e sem estímulo das bactérias gram-positivas e gram-negativas, acrescidas e não de IFN- γ .

Efeito	Nível	Valor p
Global do tipo de macrófago	-	0,785
Global do tipo de cimento	-	0,689
Global dos estímulos utilizados	-	0,000
Dos estímulos utilizados	Macrófago M1	0,000
	Macrófago M2	0,000
	Controle	0,000
Dos estímulos utilizados	Cimento MTA-Ângelus	0,000
	Cimento ProRoot	0,000

ANEXO 1 – Cópia da autorização do CETEA (Comitê de ética em experimentação animal) para realização da pesquisa.