

DANIELA CRISTINA DINIZ FERREIRA

MEDIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE  
FIBROBLASTOS DE POLPA DE DENTES DECÍDUOS  
FRENTE A MATERIAIS CAPEADORES PULPARES: ANÁLISE  
DE PRODUÇÃO DE INTERLEUCINAS 1 BETA E 8.

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA CRISTINA DINIZ FERREIRA

Mediação da resposta inflamatória de fibroblastos de polpa de dentes decíduos frente a materiais capeadores pulpares: análise de produção de interleucinas 1 beta e 8.

Tese apresentada à Universidade Ibirapuera, para obter o Título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Biodontologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

São Paulo

2008

Ferreira, DCD. Mediação da resposta inflamatória de fibroblastos de polpa de dentes decíduos frente a materiais capeadores pulpares: análise de produção de interleucinas 1 beta e 8 [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008.

São Paulo, 25/02/2008

### Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Dedicatória

Aos meus pais, **Antonio** e **Ana**, pela dedicação, incentivo, apoio e compreensão nos momentos de alegria e tristeza em toda a minha vida.

A meu filho, **Gabriel**, minha razão de viver, pelo seu sorriso que me encoraja e me faz seguir em frente todos os dias.

As minhas irmãs, **Luana** e **Tatiana**, pelo companheirismo durante nossa convivência diária.

A **Tiago**, meu amor, amigo, companheiro, parceiro e maior incentivador pessoal e profissional.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**, pela paciência e dedicação que me incentivaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **Professores do Mestrado**, que sempre demonstraram o real significado da palavra mestre, nos ajudando sempre que necessário.

Aos **Colegas de Mestrado**, que me proporcionaram momentos de alegria e diversão durante esses dois anos de convivência.

Em especial, à minha colega de turma, **Daniela Brito**, pela grande parceria realizada e pela amizade construída nesta caminhada.

A **Adriana**, grande parceira em nossos trabalhos no laboratório em que podemos contar com sua ajuda em todos os momentos difíceis.

À **CAPES**, pelo suporte dado para a execução do curso de Mestrado, na forma da bolsa PROSUP.

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro concedido para a execução deste projeto.

Ferreira, DCD. Mediação da resposta inflamatória de fibroblastos de polpa de dentes decíduos frente a materiais capeadores pulpares: análise de produção de interleucinas 1 beta e 8 [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008.

## **RESUMO**

Após exposição do tecido pulpar, citocinas são produzidas exercendo um importante papel na regulação da resposta inflamatória. Entretanto, há pouca informação na literatura sobre a participação de fibroblastos de dentes decíduos nesse processo. O propósito deste trabalho foi verificar a participação de fibroblastos da polpa humana de dente decíduo no processo inflamatório, analisando sua capacidade de produção de IL-1 $\beta$  e IL-8. Materiais usados para capeamento pulpar foram aplicados sobre as culturas na forma de meio condicionado e divididos nos seguintes grupos: controle negativo (meio fresco); controle positivo (lipopolissacarídeo bacteriano - LPS); hidróxido de cálcio em pó; agregado de trióxidos minerais (MTA); sistema adesivo; formocresol diluído. Após 24 horas de contato dos meios condicionados com as células, procedeu-se a extração das proteínas e quantificação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-8 por ELISA. Os dados foram analisados por ANOVA ( $p < 0,05$ ) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Observou-se que o hidróxido de cálcio estimulou a produção de IL-1 $\beta$ , sem estimular IL-8. Por outro lado, o adesivo dentinário e o formocresol estimularam IL-8, sem estimular IL-1 $\beta$ . O MTA estimulou as duas citocinas, mas em um nível intermediário quando comparado aos outros

materiais. Concluiu-se que fibroblastos de polpa de dentes decíduos respondem imunologicamente, com a produção de IL-1 $\beta$  e IL-8, e diferentes materiais capeadores pulparem podem auxiliar na modulação desse processo.

Palavras-chave: Capeamento da polpa dentária; Fibroblastos; Citocinas

Ferreira, DCD. Mediação da resposta inflamatória de fibroblastos de polpa de dentes decíduos frente a materiais capeadores pulpares: análise de produção de interleucinas 1 beta e 8 [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008.

### **ABSTRACT**

After the exposure of the pulp tissue, cytokines are produced, playing a role in the regulation of the pulp inflammatory response. However, the literature lacks information on the participation of primary tooth fibroblasts in this process. The purpose of this study was to verify the participation of human primary tooth pulp fibroblasts in the inflammatory process, evaluating the production of IL-1 $\beta$  and IL-8 from these cells. Pulp capping materials were applied as conditioned media on cell cultures, divided in the following groups: negative control (fresh culture medium); positive control (bacterial lipopolysaccharide – LPS); calcium hydroxide (powder); mineral trioxide aggregate (MTA); adhesive resin; diluted formocresol. After 24 hours in contact with the cells, the conditioned media were removed, the proteins extracted from the cells and IL-1 $\beta$  and IL-8 quantified by ELISA. Data were analyzed by ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). It was observed that calcium hydroxide has stimulated the production of IL-1 $\beta$ , without stimulating IL-8. On the other hand, the adhesive resin and formocresol has stimulated the production of IL-8, and have not stimulated IL-1 $\beta$ . MTA has stimulated both cytokines, but in an

intermediate level when compared to the other materials. It was concluded that primary tooth fibroblasts can respond immunologically, by the production of IL-1 $\beta$  and IL-8, and different pulp capping materials can help in the modulation of this process.

Keywords: dental pulp capping, fibroblast, cytokines

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fibroblastos de polpa humana de dentes decíduos.....	34
Figura 2: Esquema ilustrando o condicionamento do meio com adesivo..	36
Figura 3: Placa de 6 poços usada no experimento .....	38
Figura 4: Produção de interleucina 1 $\beta$ frente aos grupos experimentais..	42
Figura 5: Produção de interleucina 8 frente aos grupos experimentais....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de interleucina 1 $\beta$ das amostras testadas ( $\pm$ desvio padrão).....	42
Tabela 2: Análise de variância para interleucina 1 $\beta$ .....	43
Tabela 3: Teste de Tukey para as comparações ( $p < 0,05$ ). Análise de dados para interleucina 1 $\beta$ .....	43
Tabela 4: Valores médios de interleucina 8 das amostras testadas ( $\pm$ desvio padrão).....	44
Tabela 5: Análise de variância para interleucina 8 .....	44
Tabela 6: Teste de Tukey para as comparações ( $p < 0,05$ ). Análise de dados para interleucina 8 .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μl	Microlitros
μm	Micrômetro
Ca(OH) <sub>2</sub>	hidróxido de cálcio
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Sigla em inglês para meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucléico
EDTA	Sigla em inglês para ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IRM	Sigla em inglês para intermediate restoration material
g	Grama
GSH	glutathione
LPS	Lipopolissacarídeo
MTA	Sigla em inglês para agregado de trióxidos minerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatts
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PBS	Sigla em inglês para solução tampão fosfato-salina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato
mW	miliwatts

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 Terapia pulpar .....	19
2.2 Interleucina 1 beta .....	29
2.3 Interleucina 8.....	31
3 PROPOSIÇÃO .....	33
4 MATERIAL E MÉTODO .....	34
5 RESULTADOS.....	42
6 DISCUSSÃO .....	46
7 CONCLUSÕES .....	52
REFERÊNCIAS .....	53
ANEXOS .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A manutenção da vitalidade pulpar é uma preocupação constante nos procedimentos odontológicos. O capeamento pulpar direto e a pulpotomia são tipos de tratamentos conservadores da polpa dentária com o intuito de manter a vitalidade e integridade do tecido pulpar.

O capeamento pulpar direto consiste na colocação de um material diretamente sobre a polpa exposta, a fim de protegê-la contra uma injúria adicional e permitir a cicatrização e o reparo do tecido pulpar (SCHUURS *et al.*, 2000; AEINEHCHI *et al.*, 2002). A pulpotomia tem como objetivo a remoção total da polpa coronária, mantendo a porção radicular e colocando um material sobre o tecido pulpar remanescente (RANLY e GARCIA-GODOY, 2000).

As polpas dos dentes decíduos e permanentes respondem diferentemente ao trauma, invasão bacteriana, irritação e material utilizado no capeamento. Alguns autores limitam este procedimento a uma pequena exposição pulpar em dentes decíduos, devido aos riscos de reabsorção interna, inflamação pulpar crônica e necrose, sugerindo a

realização da pulpotomia como alternativa ao capeamento pulpar direto (KOPEL, 1992; RANLY e GARCIA-GODOY, 2000).

Por muitos anos, o formocresol tem sido empregado e aceito como material de escolha para pulpotomia em dentes decíduos (HILL *et al.*, 1991; EIDELMAN *et al.*, 2001). Entretanto, devido à presença do formaldeído, que tem potencial mutagênico e carcinogênico, novos estudos têm sido feitos para avaliar os efeitos citotóxicos do formocresol e sua possível difusão nos tecidos adjacentes (WATERHOUSE *et al.*, 2000; EIDELMAN *et al.*, 2001; AGAMY *et al.*, 2004; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

O cimento de hidróxido de cálcio tem sido largamente utilizado como material capeador (KIBA *et al.*, 2000; ERSIN e ERONAT, 2005). O contato direto do hidróxido de cálcio com a polpa exposta cria uma área de necrose superficial devido ao elevado pH do material que causa uma leve irritação da polpa ao mesmo tempo em que estimula a defesa e o reparo através da formação de ponte de dentina (ALLIOT-LICHT *et al.*, 1994; COX *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000). Entretanto, alguns trabalhos relatam a dissolução do hidróxido de cálcio ao longo do tempo, o que provocaria falhas na barreira contra a penetração bacteriana (COX e SUZUKI, 1994; COX *et al.*, 1998; SCHUURS *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2000; DEMARCO *et al.*, 2001). Conseqüentemente, outras técnicas de capeamento que estimulam a cicatrização pulpar têm sido estudadas nas últimas décadas.

Dentre estas técnicas, chama atenção o uso de sistemas adesivos sobre a exposição pulpar que, segundo alguns estudos, permite a formação de uma camada híbrida impermeável (COX *et al.*, 1995; COX *et al.*, 1998; KIBA *et al.*, 2000). Esta camada promove um vedamento a longo prazo contra a microinfiltração marginal e lesões de cárie recorrentes (COX *et al.*, 1998). A formação da ponte de dentina pode ser histologicamente demonstrada após aplicação de adesivos resinosos na polpa exposta (TARIM *et al.*, 1998). Brännström e Vojinovic (1976) demonstraram que a inflamação pulpar é causada pela microinfiltração de bactérias e não pela ação química do material. Entretanto, alguns estudos mostraram resultados insatisfatórios com o uso dos sistemas adesivos (PAMEIJER e STANLEY, 1998; HEBLING *et al.*, 1999b; DEMARCO *et al.*, 2001; STANISLAWSKI *et al.*, 2003). Os efeitos citotóxicos resultam da liberação de componentes resinosos promovendo uma reação inflamatória persistente no tecido pulpar (HEBLING *et al.*, 1999a; COSTA *et al.*, 2000; SOUZA COSTA *et al.*, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2005; ERSIN e ERONAT, 2005; DE SOUZA COSTA *et al.*, 2007).

Mais recentemente, o cimento agregado de trióxidos minerais (MTA) foi desenvolvido para o tratamento de perfurações radiculares. O MTA é constituído por silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato tricálcio e aluminoferrito tetracálcio. A resposta biológica ao MTA e seu mecanismo de ação são similares ao hidróxido de cálcio

(CAMILLERI e PITT FORD, 2006; TAKITA *et al.*, 2006). Devido as suas propriedades físicas e químicas, estudos têm sido realizados para investigar sua capacidade de selamento, resposta tecidual e citotoxicidade (PITT FORD *et al.*, 1996). A capacidade de selamento e a biocompatibilidade do MTA proporcionam a formação de ponte de dentina (HOLLAND *et al.*, 2001; FARACO e HOLLAND, 2001; AEINEHCHI *et al.*, 2002; CAMILLERI e PITT FORD, 2006). Quando comparado com o cimento à base de hidróxido de cálcio que pode ser dissolvido, o MTA demonstrou ter baixa solubilidade (PITT FORD *et al.*, 1996).

Cada material utilizado como protetor pulpar gera respostas teciduais diferentes, de acordo com o método que o avalia. A avaliação dos efeitos destes materiais sobre o metabolismo das células pulpares pode ser feita através do cultivo celular (ALLIOT-LICHT *et al.*, 1994; DEMARCO *et al.*, 2001; STANISLAWSKI *et al.*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2005; TAKITA *et al.*, 2006). Esta técnica permite o controle das condições fisiológicas do meio, como pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Porém, requer o controle da contaminação e troca periódica do meio de cultura (COSTA e SOUZA, 2005).

Dentre as possibilidades de estudos da atividade celular frente a diferentes materiais, a produção de citocinas é um dos fatores mais importantes no que diz respeito à resposta inflamatória. Algumas células da polpa produzem as interleucinas 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e 8 (IL-8) diante

de uma injúria tecidual. A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória envolvida no processo inflamatório agudo e crônico e na cicatrização do tecido pulpar. IL-1 age localmente no recrutamento de células inflamatórias (incluindo fibroblastos) e exerce vários efeitos biológicos. Sistemicamente, IL-1 induz a resposta aguda e regula a produção de agentes vasodilatadores (D'SOUZA *et al.*, 1989; LERTCHIRAKARN *et al.*, 1998). IL-1 $\beta$  é uma forma ativa predominante da IL-1 e desempenha um importante papel na progressão da inflamação pulpar (HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; BARKHORDAR *et al.*, 2002). Além disso, a IL-1 $\beta$  pode estimular a sintetizar colágeno tipo I por fibroblastos da polpa sugerindo sua participação na cicatrização (HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; LERTCHIRAKARN *et al.*, 1998; BARKHORDAR *et al.*, 2002).

A IL-8 é uma importante quimiocina inflamatória produzida por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, monócitos, linfócitos e células endoteliais, e é uma potente indutora da quimiotaxia e ativação de neutrófilos (NAGAOKA *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003). IL-8 pode iniciar e aumentar o processo inflamatório em lesões pulpares e é responsável pelo recrutamento de células imunes para o local (LEVIN *et al.*, 1999; SCHIMAUCHI *et al.*, 2001). Fibroblastos pulpares podem contribuir para regulação dos níveis de IL-8 na inflamação (NAGAOKA *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003), mas pouco se sabe sobre a capacidade de fibroblastos de polpas de dentes

decíduos em participar do processo inflamatório. Baseado nesta dúvida é que foi desenvolvido o projeto.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Terapia pulpar**

Brännström e Vojinovic (1976) verificaram a resposta pulpar frente à contaminação bacteriana de 3 materiais de preenchimento (resina composta, resina acrílica e cimento de silicato) aplicados em cavidades profundas de 60 pré-molares extraídos por razões ortodônticas. Os resultados demonstraram que o dano pulpar pode ocorrer não apenas pela irritação química do material, mas pela contaminação bacteriana no espaço entre o dente e o preenchimento.

Hill *et al.* (1991) avaliaram o grau de citotoxicidade do formocresol e glutaraldeído em cultura de fibroblastos pulpares e células HeLa, além de determinar as concentrações antimicrobianas adequadas dessas substâncias para serem usadas em pulpotomias. A concentração de 0,75% de formocresol já é necessária para matar as 9 espécies de microorganismos avaliados. O uso do glutaraldeído a 6,25% pode ser

usado como substituto do formocresol em pulpotomias de dentes decíduos devido ao seu menor potencial citotóxico.

Kopel (1992) descreveu as principais características clínicas, radiográficas e histológicas dos dentes decíduos que devem ser observadas para indicação do capeamento pulpar direto. A revisão da literatura destaca o hidróxido de cálcio como material mais utilizado sobre a polpa exposta, porém alguns estudos relataram reabsorção interna, inflamação pulpar crônica e necrose quando este material foi colocado sobre a polpa de dentes decíduos.

Alliot-Licht *et al.* (1994) compararam hidróxido de cálcio e hidroxiapatita como agentes capeadores pulpares em cultura de fibroblastos da polpa humana. A hidroxiapatita permitiu a formação de tecido duro, enquanto que sob o hidróxido de cálcio apareceu uma área necrótica. Na presença do hidróxido de cálcio, as células exibiram alteração da morfologia, síntese de DNA, atividade de fosfatase alcalina e síntese de proteínas.

Em 1994, Cox e Suzuki descreveram as vantagens e desvantagens do uso do hidróxido de cálcio. Como vantagens, os autores destacaram que seu alto pH neutraliza o baixo pH dos tecidos infectados e estimula a cicatrização e o reparo. Por outro lado, ressaltaram que a dissolução do hidróxido de cálcio a longo prazo pode resultar em microinfiltração bacteriana e que os primers podem ser uma alternativa

como agente capeador, já que a hibridização diminui os riscos de microinfiltração.

Cox *et al.* (1995) ressaltaram a biocompatibilidade dos adesivos resinosos com a dentina e o tecido pulpar. Segundo os autores, a aplicação do adesivo promove um selamento biológico permanente que resiste à microinfiltração bacteriana evitando a hipersensibilidade dentinária, inflamação e necrose pulpar que ocorrem devido a uma falha no selamento da interface dente-restauração.

Pitt Ford *et al.* (1996) avaliaram a resposta pulpar após aplicação de MTA e hidróxido de cálcio diretamente sobre a polpa exposta de 12 dentes em macacos e observaram a formação de ponte de dentina e ausência de inflamação quando o MTA foi utilizado. Além disso, destacaram a efetividade do MTA como capeador pulpar devido a sua biocompatibilidade, capacidade de selamento e prevenção da infiltração bacteriana.

Cox *et al.* (1998) avaliaram a resposta histológica de polpas de macacos expostas e não-expostas quando capeadas com sistemas adesivos. Os adesivos e as resinas compostas foram biologicamente compatíveis com os tecidos pulparem quando colocados nas polpas expostas e não-expostas.

Pameijer e Stanley (1998) descreveram os resultados de 5 diferentes tipos de sistemas adesivos convencionais aplicados sobre

polpas expostas de animais primatas. Apesar da formação de ponte de dentina observada em alguns dentes capeados com sistemas adesivos, os autores contra-indicam o uso da técnica de ataque ácido total como capeamento pulpar direto em substituição ao hidróxido de cálcio.

Tarim *et al.* (1998) verificaram a resposta histológica dos 2 sistemas adesivos em dentes de macacos. Em polpas não-expostas, os adesivos mostraram respostas pulpares similares, selamento marginal e foram biologicamente aceitáveis.

Hebling *et al.* (1999a) compararam a biocompatibilidade de um sistema adesivo e do hidróxido de cálcio quando aplicados sobre polpas expostas de 32 pré-molares humanos, em intervalos de 7, 30 ou 60 dias após o procedimento. Os autores observaram que, em contato direto com o tecido pulpar, o adesivo provocou uma reação inflamatória persistente que inibiu a completa formação da ponte de dentina, contra-indicando o uso deste material para capeamento pulpar direto em dentes humanos.

Em outro estudo, Hebling *et al.* (1999b) avaliaram a resposta do complexo dentina-polpa após aplicação de sistema adesivo em cavidades profundas de 46 pré-molares humanos. Os dentes foram extraídos após 7, 30 ou 60 dias e analisados histologicamente. Os resultados mostraram uma persistente resposta inflamatória que variava de acordo com a quantidade de dentina remanescente. No grupo em que

o remanescente dentinário foi protegido com hidróxido de cálcio antes da aplicação do adesivo, o tecido pulpar exibiu características histológicas normais.

Em 2000, Kiba *et al.* analisaram a resposta pulpar após aplicação de dois tipos de sistemas adesivos em polpas dentais expostas. A análise histopatológica do capeamento pulpar direto foi realizada em intervalos de 7, 30 ou 90 dias. A utilização de EDTA antes da aplicação do adesivo sobre a polpa mostrou resposta mais severa que o sistema adesivo auto-condicionante. O hidróxido de cálcio permitiu a formação de ponte de dentina, apesar da necrose observada na camada superficial.

Ranly e Garcia-Godoy (2000) relataram os materiais mais utilizados no passado e na atualidade para a terapia pulpar de dentes decíduos e permanentes jovens descritos na literatura, destacando o uso de hidróxido de cálcio e os sistemas adesivos para capeamento pulpar direto e do formocresol para pulpotomia.

Schuurs *et al.* (2000) descreveram a utilização de hidróxido de cálcio e adesivos resinosos para capeamento pulpar e, de acordo com a literatura, salientaram que o hidróxido de cálcio apresenta melhores resultados que os adesivos.

Costa *et al.* (2000) avaliaram a biocompatibilidade de dois adesivos resinosos e um cimento de hidróxido de cálcio. 44 tubos de polietileno foram preenchidos com estes materiais e implantados no dorso

de ratos. A análise histológica revelou que os adesivos promoveram uma reação inflamatória moderada a severa em 7 dias, que diminuiu após 30 e 60 dias. Por outro lado, hidróxido de cálcio formou tecido conjuntivo cicatricial quase completo em 30 dias.

Waterhouse *et al.* (2000) compararam clínica e radiograficamente 84 molares decíduos pulpotomizados tratados com formocresol e hidróxido de cálcio. Os dentes foram avaliados em intervalos de 6 meses a 2 anos. 84% dos dentes tratados com formocresol e 77% dos dentes tratados com hidróxido de cálcio tiveram sucesso clínico e radiográfico. O hidróxido de cálcio pode ser usado como alternativa ao formocresol na terapia pulpar de dentes decíduos.

Demarco *et al.* (2001) avaliaram a biocompatibilidade de 2 sistemas adesivos aplicados em cultura celular (*in vitro*) e polpas dentais humanas de 20 terceiros molares (*in vivo*) que foram extraídos após 30 ou 90 dias. Os autores observaram que hidróxido de cálcio promoveu cicatrização pulpar em todos os dentes e exibiu menores efeitos citotóxicos que os 2 adesivos avaliados.

Eidelman *et al.* (2001) compararam MTA e formocresol em pulpotomias de 45 molares decíduos. Apenas 32 dentes foram avaliados clínica e radiograficamente entre 6 e 30 meses, sendo que o MTA foi utilizado em 15 molares e o formocresol nos outros 17. Apenas 1 dente tratado com formocresol teve falha (reabsorção interna) e nenhum dos

dentes tratados com MTA mostrou qualquer patologia. O MTA mostrou sucesso clínico e radiográfico como material usado após pulpotomia de dentes decíduos, podendo ser um potencial substituto do formocresol.

Faraco e Holland (2001) observaram a resposta da polpa de 30 dentes de cachorros quando MTA e hidróxido de cálcio foram utilizados como materiais capeadores. Após 2 meses, a análise histológica demonstrou formação de tecido duro e ausência de infiltrado inflamatório em todos os dentes tratados com MTA, que exibiu resultados superiores ao hidróxido de cálcio.

Holland *et al.* (2001) estudaram o comportamento da polpa dental de cachorros após pulpotomia e subsequente proteção do tecido remanescente com MTA e cimento Portland, e verificaram bons resultados com os dois materiais testados.

Souza Costa *et al.* (2001) avaliaram a resposta de 33 polpas de pré-molares humanos após capeamento pulpar direto com sistema adesivo autocondicionante e hidróxido de cálcio. Após 5, 30 e 120-300 dias, os dentes foram extraídos e analisados microscopicamente. Os resultados evidenciaram resposta inflamatória leve a moderada nas polpas capeadas com adesivo, que diminuiu com o tempo. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio é o material capeador de escolha para polpas expostas e contra-indicam o uso de adesivo autocondicionante com esta finalidade.

Aeinehchi *et al.* (2002) compararam MTA e hidróxido de cálcio como materiais capeadores aplicados sobre a polpa exposta de 24 terceiros molares inferiores. Após 1 semana, 2, 3 e 6 meses, os dentes foram extraídos para realizar a análise histopatológica. Os dois materiais permitiram a formação de ponte de dentina, porém os dentes capeados com hidróxido de cálcio exibiram inflamação mais frequentemente e com maior severidade.

Em 2003, Stanislawski *et al.* utilizaram a forma monomérica TEGDMA para investigar os efeitos citotóxicos em cultura de fibroblastos humanos pulpares e gengivais. Os resultados mostraram que TEGDMA induz a toxicidade de fibroblastos associada com uma rápida e drástica depleção de GSH (glutathione) seguida pela produção de espécies oxigênio-reativas.

Agamy *et al.* (2004) compararam MTA branco, MTA cinza e formocresol utilizados após pulpotomia em dentes decíduos. As avaliações clínicas e radiográficas foram feitas após 1, 3, 6 e 12 meses. Os dentes tratados selecionados para análise histológica foram extraídos após 6 meses. O MTA branco e cinza permitiram a formação de ponte de dentina, entretanto o MTA branco mostrou resposta pulpar menos favorável que MTA cinza. Pobre deposição de dentina secundária foi observada quando o formocresol foi utilizado.

Cavalcanti *et al.* (2005) avaliaram os efeitos citotóxicos de materiais utilizados como capeadores pulparem diretos em fibroblastos de polpa dentária humana. Os resultados demonstraram que as substâncias liberadas pelo adesivo foram citotóxicas para as células em cultura, enquanto que as substâncias liberadas pelo hidróxido de cálcio foram biocompatíveis.

Ersin e Eronat (2005) investigaram a biocompatibilidade de um sistema adesivo convencional comparado com hidróxido de cálcio quando aplicados em polpas expostas de 30 dentes de ovelha e 20 pré-molares humanos. Os dentes foram extraídos 7 ou 90 dias após o tratamento e preparados para análise histológica. O hidróxido de cálcio mostrou resposta pulpar mais favorável, enquanto que o adesivo provocou inflamação persistente mesmo com a formação de ponte de dentina.

Huang *et al.* (2005) analisaram os efeitos de materiais utilizados na terapia pulpar em células ósseas obtidas de osteosarcoma humano e a produção de IL-2, IL-4 e IL-10. MTA, Super EBA e hidróxido de cálcio exibiram maiores níveis de IL-2 em relação ao grupo controle, enquanto que as células em contato com MTA exibiram níveis aumentados de IL-4 e IL-10 quando comparado com os outros materiais. MTA revelou maior resposta antiinflamatória, podendo modular a liberação de componentes inflamatórios e a resposta inflamatória.

Camilleri e Pitt Ford (2006) descreveram os constituintes e as propriedades biológicas do MTA. De acordo com a literatura, os estudos demonstraram a biocompatibilidade do MTA quando comparado com outros materiais.

Srinivasan *et al.* (2006) descreveram os materiais alternativos ao formocresol em pulpotomia de molares decíduos. Após revisão da literatura, os autores concluíram que sulfato ferroso e MTA são alternativas promissoras ao uso do formocresol, já que alguns estudos ressaltaram que o hidróxido de cálcio pode causar reabsorção interna quando utilizado na terapia pulpar de dentes decíduos.

Takita *et al.* (2006) analisaram o efeito do MTA na proliferação de células da polpa dental humana em cultura e observaram que o MTA aumenta potencialmente a proliferação destas células devido a constante liberação de íons cálcio, já que este material é rico em óxido de cálcio que é convertido em hidróxido de cálcio quando em contato com fluido tecidual.

Em 2007, de Souza Costa *et al.* avaliaram a biocompatibilidade de dois cimentos a base de resina e um sistema adesivo autocondicionante aplicados em cavidades profundas de 47 dentes humanos. Após 5 ou 30-85 dias, os dentes foram extraídos e analisados histologicamente. No período de 7 dias, o adesivo autocondicionante causou maior resposta inflamatória pulpar e

desorganização tecidual que os outros materiais, entretanto, após 30-85 dias, observou-se leve ou nenhuma resposta inflamatória em todos os materiais. Concluiu-se que os materiais testados são biocompatíveis para serem empregados em cavidades profundas de dentes humanos.

## **2.2 Interleucina 1 beta**

Para um melhor conhecimento do papel de IL-1 na inflamação pulpar, D'Souza *et al.* (1989) compararam os níveis de IL-1 em polpas de dentes hígidos, cariados e periodontalmente afetados. A atividade de IL-1 foi maior em polpas de dentes cariados sintomáticos devido à presença do infiltrado de células inflamatórias que aumenta a expressão de IL-1.

Em 1997, Hosoya e Matsushima analisaram a produção de IL-1 $\beta$  em células de polpa dentária humana estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e verificaram que estas células liberam IL-1 $\beta$  em tempo e dose-dependente desempenhando um importante papel na progressão da inflamação pulpar.

Koh *et al.* (1997) avaliaram a produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e atividade de fosfatase alcalina em osteoblastos humanos na presença de MTA em intervalos de 1, 6, 12, 24, 48, 72, 144 e 192 h. Os níveis das interleucinas foram maiores após 144 h, com valores aumentados em

todos os períodos de tempo. A atividade de fosfatase alcalina apresentou-se normal. MTA estimula o crescimento celular e a produção de interleucinas por osteoblastos humanos.

Em outro estudo, Koh *et al.* (1998) verificaram a resposta celular e a produção de citocinas em intervalos de 1 a 144 h por osteoblastos derivados de osteosarcoma humano na presença de MTA e IRM utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ELISA. MEV revelou diferentes padrões de morfologia celular para os dois materiais. Os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 estiveram elevados com 144 h e aumentados em todos os períodos na presença do MTA. Por outro lado, quantidades indetectáveis de interleucinas foram observadas na presença de IRM. MTA oferece um substrato biologicamente ativo para células ósseas e estimula a produção de interleucinas.

Lertchirakarn *et al.* (1998) investigaram o efeito de IL-1 $\beta$  na proliferação de fibroblastos pulpares e síntese de colágeno *in vitro*. Os resultados mostraram que IL-1 $\beta$  é um potente mediador da síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e de colágeno por fibroblastos pulpares, porém inibe a proliferação destas células no processo de cicatrização.

Barkhordar *et al.* (2002) verificaram a atividade de IL-1 $\beta$  e seu efeito na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos derivados de polpas dentais humanas saudáveis e doentes. Os resultados mostraram que os níveis de IL-1 $\beta$  foram significativamente maiores em fibroblastos de

polpas doentes que também tiveram níveis maiores de síntese de colágeno.

### **2.3 Interleucina 8**

Nagaoka *et al.* (1996) investigaram a expressão de IL-8 em cultura de fibroblastos de polpa dental humana após estimulação com LPS. Os níveis de IL-8 aumentaram após 2 horas de exposição, atingindo um máximo em 4 a 8 horas, e declinando após 48 horas. Os resultados indicaram que fibroblastos pulpares podem expressar IL-8 sob estimulação com LPS.

Em 1999, Huang *et al.* estudaram a expressão de IL-8 em polpas dentais humanas normais e inflamadas, e verificaram que os níveis de IL-8 foram significativamente maiores em polpas inflamadas obtidas de dentes com pulpite irreversível.

Levin *et al.* (1999) avaliaram a expressão de IL-8 por odontoblastos humanos obtidos de terceiros molares sadios que foram mantidos em cultura e expostos ao LPS no 4º dia. As células em cultura exibiram baixos níveis de IL-8 que aumentaram após exposição ao LPS, sugerindo que odontoblastos podem detectar a presença de antígenos e estimular a resposta inflamatória aguda.

Schimauchi *et al.* (2001) verificaram os níveis de IL-8 e óxido nítrico em exsudatos coletados de canais radiculares de dentes humanos

durante tratamento endodôntico de rotina, além da associação desses mediadores com sintomas clínicos de periodontite periapical. Os resultados mostraram maiores níveis de IL-8 em exsudatos obtidos de lesões periapicais que tinham sintomas de dor, sugerindo que uma maior expressão de IL-8 pode ter um papel crucial no desenvolvimento dos sintomas da doença periapical.

Yang *et al.* (2003) analisaram a expressão de IL-8 por fibroblastos pulpaes humanos e osteoblastos estimulados com *Bacteroides* pigmentados. Os autores observaram que essas bactérias induzem a expressão de IL-8 por fibroblastos de polpa e osteoblastos, sugerindo a atuação como células imuno-responsivas.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este trabalho teve como objetivo verificar a participação de fibroblastos da polpa humana de dente decíduo no processo inflamatório, analisando a produção de IL-1 $\beta$  e IL-8 frente a diferentes materiais utilizados para capeamento pulpar.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Para este estudo foram utilizados fibroblastos de polpa humana de dentes decíduos obtidos do Banco de Células do Laboratório de Biodontologia da Universidade Ibirapuera, conforme autorização expedida pela Responsável do Laboratório (Anexo 1). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera, sob o parecer 278/07 (Anexo 2).

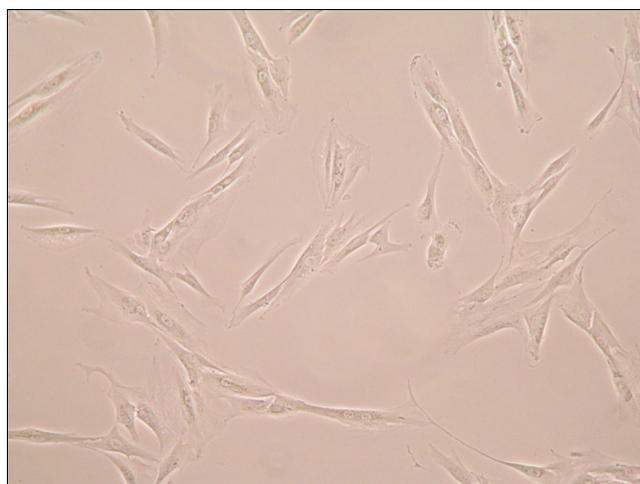


Figura 1: Fibroblastos de polpa humana de dentes decíduos

#### **4.1 Definição dos grupos experimentais**

Os materiais foram aplicados nas células cultivadas em meio condicionado e foram divididos em grupos:

- controle negativo (meio de cultura fresco sem condicionamento);
- controle positivo (meio de cultura fresco com LPS);
- hidróxido de cálcio PA (Fórmula e Ação, Brasil);
- agregado de trióxidos minerais (MTA Bio, Angelus, Brasil);
- sistema adesivo (Prime & Bond 2.1, Dentsply, Brasil);
- formocresol diluído (Fórmula e Ação, Brasil).

#### **4.2 Preparo das substâncias**

No grupo controle positivo, foi adicionado ao meio de cultura 10 ng/mL de LPS para induzir a produção de interleucinas pelas células.

O pó de hidróxido de cálcio foi colocado no fundo de um tubo de 15 mL de capacidade com o auxílio de uma espátula nº. 24 estéril. O MTA foi manipulado com espátula nº. 24 e placa de vidro estéril, seguindo as instruções do fabricante, e colocado no fundo do tubo de

ensaio de 15 mL. O adesivo dentinário e o formocresol diluído foram gotejados diretamente no fundo de diferentes tubos de 15 mL.

Os materiais foram mensurados em balança analítica para serem utilizados na proporção de 0,2 g para cada 1 mL de meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

O adesivo foi fotoativado com lâmpada halógena de 600 mW/cm<sup>2</sup> de potência (3M, Canadá) por 20 segundos enquanto o meio de cultura era vertido sobre ele (Figura 2).

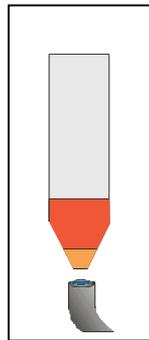


Figura 2: Esquema ilustrando o condicionamento do meio.

#### **4.3 Condicionamento dos meios de cultivo**

O meio de cultivo foi colocado em contato com as substâncias individualmente por 1 hora em estufa com atmosfera úmida e temperatura de 37°C. Após este período, os meios foram coletados com uma seringa e passados em filtros com poros de 0,22 µm (Corning, EUA)

para serem aplicados às culturas numa diluição de 1% (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

#### **4.4 Cultivo celular**

Para os experimentos foram utilizados fibroblastos da polpa dentária de dentes decíduos humanos entre a quinta e a décima passagens cedidos pelo laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (10000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL em cloreto de sódio 0,9%; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em frascos de 75 cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas em câmara úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas do fundo do frasco com o uso de solução de tripsina a 0,25% (Sigma) em solução tampão fosfato salina (PBS) e plaqueadas em placas de 6 poços de 35 mm de diâmetro (Figura 3).

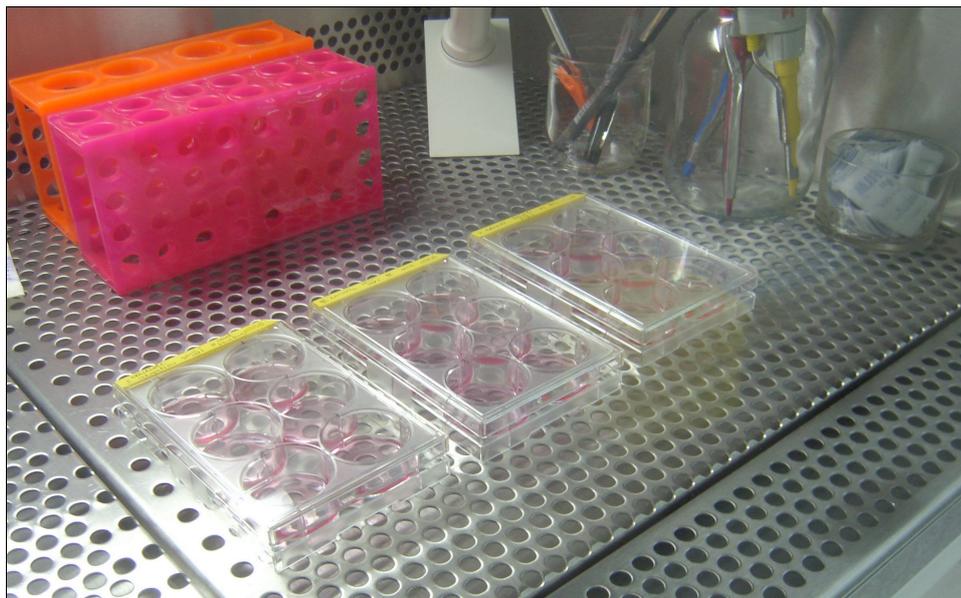


Figura 3: Placas de 6 poços usadas no experimento.

#### **4.5 Indução com os materiais**

Após 24 horas, quando as células estavam aderidas no fundo dos poços, o meio de cultura DMEM foi substituído pelo meio de cultura condicionado pelas substâncias. O meio condicionado permaneceu em contato com as células durante 24 horas.

#### **4.6 Extração das proteínas**

Após o período de indução, foi realizada a aspiração dos meios de cada poço que foram lavados duas vezes com PBS gelado (cerca de 4°C).

Durante os procedimentos de extração, as placas foram mantidas sempre sobre gelo a fim de evitar a volatilização das proteínas. Em cada poço, colocou-se 100 µl de RIPA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) com 1 µl de inibidor de protease (Sigma) que foram deixados em contato com as células por 15 minutos. Após este período, realizou-se uma raspagem vigorosa dos poços com auxílio de *scraper* e o conteúdo obtido pela raspagem foi coletado e transferido para diferentes tubos eppendorf (um para cada poço). Esses tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm (Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) sob refrigeração a 4°C.

Após a centrifugação, foi feita a coleta do sobrenadante e realizada a diluição da amostra na proporção 1:4 (100 µl da amostra para 300 µl de diluente presente no kit de ELISA).

#### **4.7 ELISA**

A quantificação das citocinas foi feita através de kits de ELISA para IL-1β (RPN-5971, Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) e IL-8 (RPN-5969, Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra).

As instruções de diluição, preparo e leitura foram fornecidas pelo fabricante dos kits e seguiram a descrição abaixo:

- Preparo da solução de lavagem fornecida pelo kit (acrescentou-se 475 mL de água destilada em 25 mL da solução de lavagem);
- Colocação das amostras padrão nas posições indicadas pelo kit;
- Adição de 150  $\mu$ l de água destilada nos poços das amostras padrão e em branco;
- Adição de 100  $\mu$ l de água destilada nos poços das amostras testadas;
- Colocação de 50  $\mu$ l das amostras testadas em duplicata, nas posições indicadas pelo kit;
- Cobertura das amostras com adesivo fornecido e incubação pelo período de duas horas em temperatura ambiente;
- Aspiração e lavagem dos poços por 3 vezes, seguida de secagem;
- Adição de 100  $\mu$ l de substrato reagente TMB (fornecido com o kit) em cada poço e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Adição de 100  $\mu$ l da solução de parada do kit em cada poço;

- Determinação da densidade óptica com uso de espectrofotômetro ajustado para 450 nm, de acordo com as especificações do kit;
- Análise dos resultados comparando as densidades ópticas das amostras com os padrões.

#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados de ELISA foram analisados estatisticamente por ANOVA, numa significância de 5%. Em caso de diferenças, o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para a localização destas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Interleucina 1 beta

A produção de IL-1 $\beta$  pelos diferentes materiais está ilustrada na figura 4 e os dados expressos na tabela 1.

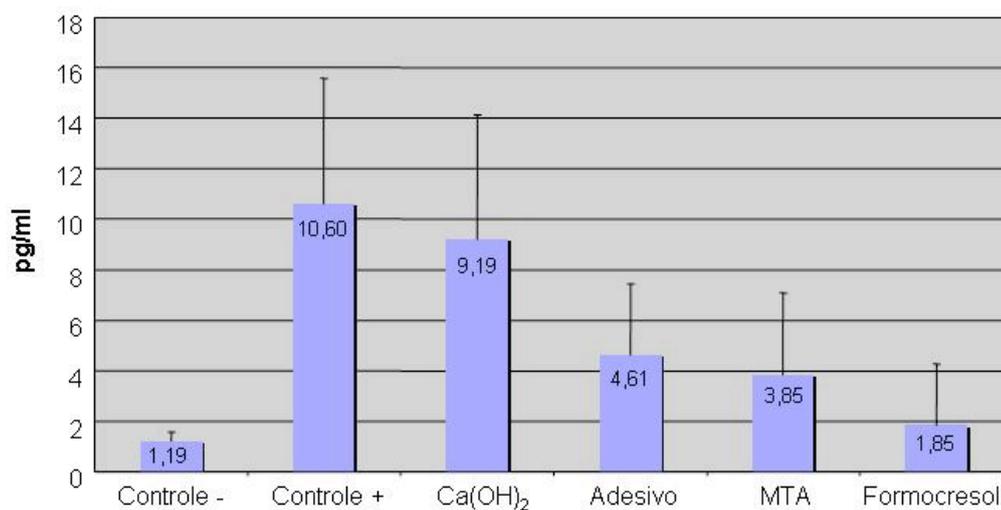


Figura 4: Produção de Interleucina 1 $\beta$  frente aos grupos experimentais.

Tabela 1: Valores médios de interleucina 1 $\beta$  das amostras testadas ( $\pm$  desvio padrão).

	Controle -	Controle +	Ca(OH) <sub>2</sub>	MTA	Adesivo	Formocresol
<b>Média</b>	1,19	10,60	9,19	4,61	3,85	1,85
<b>SD</b>	0,36	4,99	4,94	2,81	3,24	2,42

A análise estatística (Tabelas 2 e 3) mostrou diferenças entre os materiais testados e nas comparações entre os dados. Entre os materiais, observou-se que o hidróxido de cálcio estimulou maior produção de IL-1 $\beta$ , tendo valores semelhantes ao controle positivo. Os demais não estimularam a produção de IL-1 $\beta$ , ficando semelhantes ao grupo controle negativo.

Tabela 2: Análise de variância para interleucina 1 $\beta$

<b>Análise de variância</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P-value</b>	<b>F crit</b>
<b>Entre os grupos</b>	446,91318	5	89,38264	7,279035	0,000144	2,5335545
<b>Resíduo</b>	368,38388	30	12,27946			
<b>Total</b>	815,29705	35				

Tabela 3: Teste de Tukey para as comparações ( $p < 0,05$ ). Análise de dados para interleucina 1 $\beta$ .

	<b>Controle</b>		<b>Ca(OH)2</b>	<b>MTA</b>	<b>Adesivo</b>	<b>Formocresol</b>
	<b>Controle-</b>	<b>+</b>				
<b>Controle -</b>	X	x	x	X	X	X
<b>Controle +</b>	9,409*	x	x	X	X	X
<b>Ca(OH)2</b>	7,993*	1,415	x	X	X	X
<b>MTA</b>	3,415	5,993	4,578	X	X	X
<b>Adesivo</b>	2,658	6,750*	5,335	0,757	X	X
<b>Formocresol</b>	0,661	8,747*	7,332*	2,754	1,997	X

\* Diferenças estatísticas (valor crítico de Tukey = 6,152)

## 5.2 Interleucina 8

A produção de IL-8 pelos diferentes materiais está ilustrada na figura 5 e os dados expressos na tabela 4.

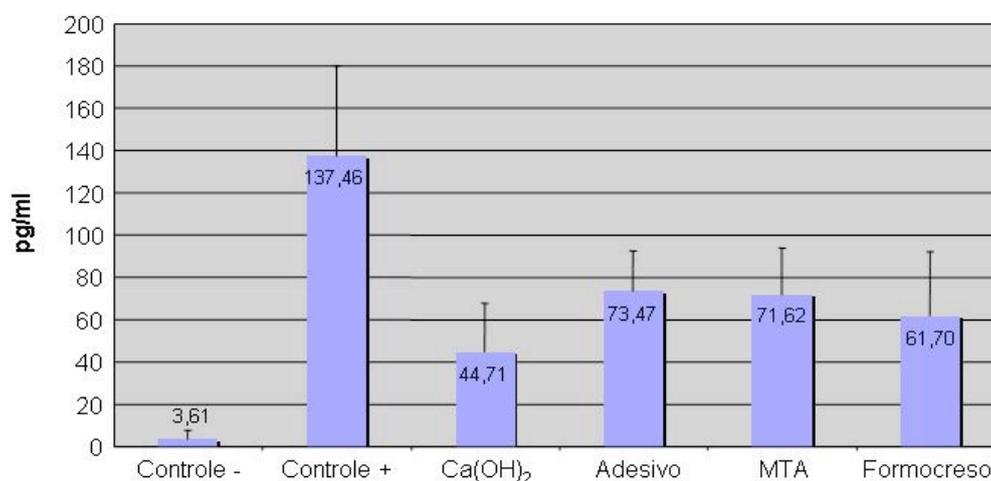


Figura 5: Produção de Interleucina 8 frente aos grupos experimentais.

Tabela 4: Valores médios de interleucina 8 das amostras testadas ( $\pm$  desvio padrão).

	Controle		Ca(OH) <sub>2</sub>	MTA	Adesivo	Formocresol
	-	+				
<b>Média</b>	3,61	137,46	44,71	73,47	71,62	61,70
<b>SD</b>	4,06	42,45	23,02	18,95	22,36	30,53

Todos os materiais, com exceção do hidróxido de cálcio, apresentaram diferenças significantes estatisticamente em relação ao controle negativo, indicando que esses materiais, exceto o hidróxido de cálcio, estimulam a produção de IL-8 (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Análise de variância para interleucina 8.

Análise de variância	SS	df	MS	F	P-value	F crit
<b>Entre os grupos</b>	57339,90693	5	11467,9814	16,6231726	7,24977E-08	2,5335545
<b>Resíduo</b>	20696,37662	30	689,879221			45
<b>Total</b>	78036,28355	35				

Tabela 6: Teste de Tukey para as comparações ( $p < 0,05$ ). Análise de dados para interleucina 8.

	Controle		Ca(OH)2	MTA	Adesivo	Formocresol
	Controle-	+				
<b>Controle -</b>	x	x	x	x	x	x
<b>Controle +</b>	133,855*	x	x	x	x	x
<b>Ca(OH)2</b>	41,110	92,746*	x	x	x	x
<b>Adesivo</b>	69,864*	63,991*	28,754	x	x	x
<b>MTA</b>	68,011*	65,844*	26,901	1,853	x	x
<b>Formocresol</b>	58,094*	75,762*	16,984	11,771	9,918	x

\* Diferenças estatísticas (valor crítico de Tukey = 46,108)

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados fibroblastos de polpa humana de dente decíduo em cultura para analisar a produção de IL-1 $\beta$  e IL-8 frente a diferentes materiais utilizados para capeamento pulpar. A análise da quantificação dessas interleucinas por ELISA mostrou que o hidróxido de cálcio estimulou a produção de IL-1 $\beta$  e não estimulou a produção de IL-8. Já os outros materiais tiveram comportamento oposto ao hidróxido de cálcio, tendo induzido a produção de IL-8 sem, no entanto, estimular a produção de IL-1 $\beta$ .

A proposta deste estudo se baseou no fato de que várias citocinas são produzidas por diferentes tipos celulares atuando no processo inflamatório agudo. Estudos têm demonstrado que fibroblastos pulpares produzem as interleucinas 1 e 8 diante de uma injúria tecidual (D'SOUZA *et al.*, 1989; NAGAOKA *et al.*, 1996; HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; LERTCHIRAKARN *et al.*, 1998; BARKHORDAR *et al.*, 2002). Entretanto, apesar de se saber que as diferenças entre histologia e fisiologia das polpas de dentes decíduos e permanentes podem levar a

diferentes respostas em relação à irritação, infecção e trauma provocado pela exposição pulpar e, conseqüente, colocação do material capeador (KOPEL, 1992), a literatura pouco informa sobre as respostas específicas de células de dentes decíduos. Por isso, este trabalho teve como objetivo verificar a participação de fibroblastos da polpa de dente decíduo no processo inflamatório, bem como a produção de IL-1 $\beta$  e IL-8 frente a diferentes materiais utilizados para capeamento pulpar.

Neste trabalho, optou-se por utilizar a técnica de cultivo celular, um estudo *in vitro* utilizado em outros estudos (ALLIOT-LICHT *et al.*, 1994; KOH *et al.*, 1998; DEMARCO *et al.*, 2001; STANISLAWSKI *et al.*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2005; TAKITA *et al.*, 2006), além de permitir o controle das condições fisiológicas do meio de cultura e da contaminação (COSTA e SOUZA, 2005).

Com essa metodologia, a utilização de meios condicionados, sugerida por Cavalcanti *et al.* (2005), permite a liberação de substâncias no meio de cultura durante a presa ou polimerização dos materiais evitando, assim, o contato direto do material com as células. Desta forma, torna-se possível reproduzir uma situação clínica e avaliar os efeitos dos materiais sobre as células pulpares. No presente trabalho optou-se pela diluição do meio condicionado a 1%, já que no estudo piloto o meio condicionado diluído a 10% mostrou-se citotóxico provocando morte celular nos grupos do adesivo e do formocresol.

A escolha do material para ser aplicado sobre a polpa exposta é de fundamental importância por causa dos efeitos deletérios que podem ser causados no tecido pulpar. O hidróxido de cálcio é o principal material utilizado como capeador pulpar, pois tem demonstrado ser biocompatível (ALLIOT-LICHT *et al.*, 1994; KIBA *et al.*, 2000; CAVALCANTI *et al.*, 2005; ERSIN e ERONAT, 2005). Além disso, este material permite o processo de cicatrização e reparo do tecido pulpar quando colocado diretamente sobre a polpa exposta com a formação da ponte de dentina (COX e SUZUKI, 1994; COX *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; SCHUURS *et al.*, 2000).

No presente estudo, observou-se que o hidróxido de cálcio possui grande capacidade de induzir a produção de IL-1 $\beta$ , o que pode ser explicado pelo fato de esta citocina ser multifuncional (D'SOUZA *et al.*, 1989; HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; LERTCHIRAKARN *et al.*, 1998; BARKHORDAR *et al.*, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Assim, uma maior quantidade de IL-1 $\beta$  pode não ser exatamente um indicativo de citotoxicidade do material, mas sim um sinal de que esta citocina, presente em várias etapas do processo inflamatório, também está relacionada a processos de limpeza da área agredida e controle da inflamação (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Já a ausência de estímulo de produção de IL-8 pelo hidróxido de cálcio está provavelmente relacionada ao pequeno potencial inflamatório deste material, particularmente no que

diz respeito ao recrutamento de neutrófilos, principal função da IL-8 (NAGAOKA *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003).

A utilização de sistemas adesivos como materiais capeadores pulpare é bastante controversa na literatura. Alguns autores mostraram resultados favoráveis com a aplicação do adesivo sobre a polpa exposta (COX *et al.*, 1995; COX *et al.*, 1998; TARIM *et al.*, 1998; KIBA *et al.*, 2000). Entretanto, os resultados apresentados em outros trabalhos demonstraram uma menor biocompatibilidade dos sistemas adesivos sobre a exposição pulpar (PAMEIJER e STANLEY, 1998; HEBLING *et al.*, 1999a; DEMARCO *et al.*, 2001), quando aplicado em cavidades profundas (HEBLING *et al.*, 1999b; DE SOUZA COSTA *et al.*, 2007) ou em cultura de células (DEMARCO *et al.*, 2001; STANISLAWSKI *et al.*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2005), principalmente pela liberação de componentes citotóxicos durante a polimerização. No presente estudo observou-se que o adesivo dentinário tem potencial de estímulo de IL-8, o que está de acordo com o potencial inflamatório observado em estudos *in vivo* (HEBLING *et al.*, 1999a; HEBLING *et al.*, 1999b; COSTA *et al.*, 2000; DEMARCO *et al.*, 2001; SOUZA COSTA *et al.*, 2001).

Assim, por apresentarem respostas semelhantes *in vivo* (WATERHOUSE *et al.*, 2000; EIDELMAN *et al.*, 2001; AGAMY *et al.*, 2004), pode-se observar que os resultados na produção de ambas as interleucinas foi semelhante entre o adesivo dentinário e o formocresol. O

formocresol é recomendado para pulpotomia de dentes decíduos em substituição ao hidróxido de cálcio que pode causar reabsorção interna quando aplicado como material capeador nestes dentes (HILL *et al.*, 1991; KOPEL, 1992; RANLY e GARCIA-GODOY, 2000; WATERHOUSE *et al.*, 2000; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

Quanto ao MTA, sabe-se que este material tem sido recentemente empregado como material capeador devido a sua alta biocompatibilidade e proporcionar resultados semelhantes ou superiores ao hidróxido de cálcio (PITT FORD *et al.*, 1996; FARACO e HOLLAND, 2001; HOLLAND *et al.*, 2001; AEINEHCHI *et al.*, 2002; CAMILLERI e PITT FORD, 2006; TAKITA *et al.*, 2006). Resultados favoráveis também podem ser observados quando este material é utilizado para capeamento pulpar direto e pulpotomia em dentes decíduos (EIDELMAN *et al.*, 2001; AGAMY *et al.*, 2004). Quanto à produção das interleucinas, o MTA se situou em estágio intermediário em relação aos outros materiais, sendo semelhante aos dois controles no caso da IL-1 $\beta$  e diferente dos dois controles no caso da IL-8. Esse padrão é um pouco mais complexo de se explicar, mas pelo já descrito para os outros materiais, é de se esperar que o MTA tenha também pequeno potencial inflamatório agudo (IL-8) sem, no entanto, deixar de regular o processo inflamatório como o hidróxido de cálcio (IL-1 $\beta$ ) (KOH *et al.*, 1997; KOH *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2005).

Neste trabalho, a análise da produção de IL-1 $\beta$  e IL-8 foi feita por ELISA, um método recomendado na literatura para realizar a quantificação de citocinas em cultura de fibroblastos de polpa humana (NAGAOKA *et al.*, 1996; HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; LERTCHIRAKARN *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1999; SHIMAUCHI *et al.*, 2001; BARKHORDAR *et al.*, 2002). Com este método, os resultados do presente estudo comprovaram que LPS estimulou maior produção de IL-1 $\beta$  e IL-8 por fibroblastos pulpare de dente decíduo em cultura, ao contrário do que foi observado no controle negativo, o que indica a adequada padronização do estudo. Alguns trabalhos demonstraram que a presença do LPS bacteriano estimula a produção de interleucinas por fibroblastos de polpa humana (NAGAOKA *et al.*, 1996; HOSOYA e MATSUSHIMA, 1997; LEVIN *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003).

Enfim, duas frentes de estudos podem decorrer deste estudo: uma comparando respostas celulares de fibroblastos de dentes decíduos e de dentes permanentes no que diz respeito aos materiais usados para capeamento pulpar direto e/ou pulpotomias. Outra frente seria a de aprofundar os estudos na resposta celular, relacionando receptores de membrana, vias de sinalização e genes envolvidos no processo, o que poderia elucidar mais precisamente os mecanismos envolvidos no processo inflamatório pulpar.

## 7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

1. Fibroblastos de polpa de dentes decíduos respondem imunologicamente a estímulos externos ao tecido, através da produção de IL-1 $\beta$  e IL-8;
2. O hidróxido de cálcio induz produção de IL-1 $\beta$  e não induz a produção de IL-8 em fibroblastos de polpa de dente decíduo;
3. O adesivo dentinário e o formocresol induzem a produção de IL-8 e não induzem a produção de IL-1 $\beta$  em fibroblastos de polpa de dente decíduo;
4. O MTA está em estágio intermediário quando comparado aos outros materiais, tendo induzido tanto IL-1 $\beta$  quanto IL-8, mas ambos em menores quantidades.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia celular e molecular. 5 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005. 580 p.

Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2002 Mar; 36(3): 225-31.

Agamy HA, Bakry NS, Mounir MMF, Avery DR. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. *Pediatr Dent* 2004 Jul-Aug; 26(4): 302-9.

Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1994 Jun; 39(6): 481-9.

---

<sup>1</sup> De acordo com o estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Barkhordar RA, Ghani P, Russell TR, Hussain MZ. Interleukin-1 $\alpha$  activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2002 Mar; 28(3): 157-9.

Brännström M, Vojinovic O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *J Dent Child* 1976 Mar/Apr; 43(2):15-21.

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006 Oct; 39(10): 747-54.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J* 2005 Aug; 38(8): 505-9.

Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000 Sep; 26(9): 512-6.

Costa CA, Souza PPC. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela, C. *Metodologia Científica*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 211-30.

Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998 Jan; 11 Spec N: S55-63.

Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc* 1994 Jul; 125(7): 823-31.

Cox CF, Suzuki S, Suzuki SH. Biocompatibility of dental adhesives. *J Calif Dent Assoc* 1995 Aug; 23(8): 35-41.

Demarco FF, Tarquinio SBC, Jaeger MMM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int* 2001 Mar; 32(3): 211-20.

D'Souza R, Brown LR, Newland JR, Levy BM, Lachman LB. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. *Arch Oral Biol* 1989 May; 34(5): 307-13.

De Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep

cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007 Apr; 81(1):175-84.

Eidelman E, Holan G, Fucks AB. Mineral trioxide aggregate vs. formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. *Pediatr Dent* 2001 Jan-Feb; 23(1): 15-8.

Ersin NK, Eronat N. The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. *Quintessence Int* 2005 Apr; 36(4): 271-80.

Faraco IMJ, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001 Aug; 17(4): 163-6.

Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 1999a Oct; 25(10): 676-82.

Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 1999b Nov; 27(8): 557-64.

Hill SD, Berry CW, Seale NS, Kaga M. Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol* 1991 Jan; 71(1): 89-95.

Holland R, Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or portland cement. *Braz Dent J* 2001; 12(2): 109-13.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 $\alpha$  production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997 Jan; 23(1): 39-42.

Huang GTJ, Potente AP, Kim JW, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Aug; 88(2): 214-20.

Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005 Apr; 73(1):123-8.

Kiba H, Hayakawa T, Nakanuma K, Yamazaki M, Yamamoto H. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. *J Oral Sci* 2000 Jun; 42(2): 69-74.

Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997 Dec; 37(3):432-9.

Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998 Aug;24(8):543-7.

Kopel HM. Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. *ASDC J Dent Child* 1992 Mar; 59(2): 141-9.

Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 $\alpha$  on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Endod* 1998 Jun; 24(6): 409-13.

Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci* 1999 Apr; 107(2): 131-7.

Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, Kawagoe M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod* 1996 Jan; 22(1): 9-12.

Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998 Jan; 11 Spec: S45-54.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 1996 Oct; 127(10): 1491-4.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000 Mar; 28(3): 153-61.

Schimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Schimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod* 2001 Dec; 27(12): 749-52.

Schuurs AHB, Gruythuysen RJM, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000 Dec; 16(6): 240-50.

Souza Costa CA, Lopes do Nascimento AB, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001 May; 17(3): 230-40.

Srinivasan V, Patchett CL, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's formocresol? Part I – a narrative review of alternative interventions and materials. *Int J Paediatr Dent* 2006 Mar; 16(2): 117-27.

Stanislowski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGDMA – induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 2003 Sep; 66(3): 476-82.

Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006 May; 39(5): 415-22.

Tarim B, Hafez AA, Suzuki SH, Suzuki S, Cox CF. Biocompatibility of Optibond and XR-Bond adhesive systems in nonhuman primate teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998 Feb; 18(1): 87-99.

Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM. An investigation of the relative efficacy of Buckley's formocresol and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. *Br Dent J* 2000 Jan; 188(1): 32-6.

Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoclasts. *Int Endod J* 2003 Nov; 36(11): 774-9.

## ANEXO 1

Autorização para o uso de células

## ANEXO 2

### Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)