

Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos em relação aos reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos

Paulo Tadeu da SILVA^a, Renato de Toledo LEONARDO^b,
Iracilda Zeppone CARLOS^c, Idomeo BONETTI FILHO^b

^aPós-Graduado em Odontologia, Nível de Doutorado em Endodontia,
Faculdade de Odontologia, UNESP, 14801-903 Araraquara - SP

^bDepartamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UNESP
14801-903 Araraquara - SP

^cDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP
14801-902 Araraquara - SP

Silva PT, Leonardo RT, Carlos IZ, Bonetti Filho I. Citotoxicity evaluation of endodontical cements regarding the oxygen and nitrogen intermediate reactives in peritoneais macrophages of mice culture. Rev Odontol UNESP. 2005; 34 (1): 17-23.

Resumo: Analisou-se a citotoxicidade dos cimentos endodônticos Endofill, Sealapex e Polifil quanto à quantificação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos, cujas concentrações viáveis de sobrevivência celular foram antes obtidas por um método de análise colorimétrica, o M.T.T. Os resultados, a discussão e a constatação evidenciaram que o cimento que apresentou menor índice de citotoxicidade e equivalência de quantificação foi o Sealapex em relação ao Endofill e Polifil, embora todos tenham sido menos citotóxicos em relação ao Grupo Controle Zimosan-A para H₂O₂ e ao LPS para o NO.

Palavras-chave: *Sobrevivência celular; óxido nítrico; peróxido de hidrogênio; citotoxicidade celular anticorpo-dependente; materiais restauradores do canal radicular.*

Abstract: The citotoxicity of the following endodontical cements was analyzed: Endofill, Sealapex and Polifil concerning the Nitric Oxid (NO) quantification and the Hydrogen Peroxid (H₂O₂) in peritoneais macrophages medium of mice, whose viable concentrations of cell survival were obtained before through a colorimetric analysis method, using the M.T.T. The results, after being discussed and checked, showed that the cement which were presented lower citotoxicity level was the Sealapex, and presented quantification equivalence concerning the Endofill and Polifil, although all of them were less citotoxic concerning the Zimosan-A Control Group for H₂O₂ and the LPS for NO.

Keywords: *Cell survival; nitric oxide; hydrogen peroxide; antibody-dependent cell cytotoxicity; root canal filling materials.*

Introdução

O objetivo da obturação dos sistemas de canais radiculares é tornar impermeável ou à prova de sistemas bacterianos de uma forma mais consistente possível o espaço produzido pelo preparo biomecânico. O material inserido no interior do canal entrará em contato com os tecidos conjuntivos apicais

devido, por isso, ser o mais biocompatível possível²¹. O reconhecimento desse corpo estranho (material obturador) se faz por meio dos linfócitos T e macrófagos³. A fagocitose de corpos estranhos efetuada pelos macrófagos está relacionada com os níveis de explosão oxidativa mitocondrial^{7,10,13,14}.

Dessa maneira, quanto maior a citotoxicidade² do material endodôntico a ser fagocitado, mais intenso é o “nível de produção oxidativa” e conseqüentemente a liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO)¹³⁻¹⁵.

O objetivo deste estudo foi avaliar, através da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, a liberação de H_2O_2 e NO como resultado do contato com diferentes materiais de obturação: Endofill (Dentsply), Sealapex (Kerr) e o cimento experimental da resina poliuretana derivada da mamona, o Polifil®, acrescido de óxido de zinco (S.S.White) como agente radiopacificador.

Material e método

Comitê de ética em pesquisa

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, reunido em 16 de junho de 2003, tendo sido aprovado em 24 de junho de 2003, conforme do Ofício CEEA-FOAr nº 21/2003, com relatório final apresentado em março de 2004, obtendo-se o certificado do Comitê de Ética, em 16 de fevereiro de 2005.

Obtenção e preparação dos animais com as reações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO)

Nas metodologias foi utilizado um total suficiente de 20 camundongos “Swiss”, machos, de 6 a 8 semanas de idade, isogênicos, pesando entre 18 e 25 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Brasil. Cada camundongo serviu de fonte de macrófagos peritoneais para cada cultura².

Introduziu-se na cavidade abdominal de cada animal 3,0 ml de solução de tioglicolato de sódio à 3% e os mesmos tiveram água “*ad libitum*”, durante a realização total da pesquisa. Após este período, os animais foram mortos, para todos os experimentos, por profusão anestésica com a droga hidrato de cloral a 10%, utilizando-se uma sobredose de 0,7 mg/mL para cada 100 g de peso por animal. Esses procedimentos baseiam-se nas orientações do “Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentacion”⁹, seguidos da assepsia do abdômen com bolinha de álcool iodado a 0,3% e da exposição do peritônio. As etapas seguintes foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Preparação dos cimentos e obtenção das soluções dos cimentos em concentrações de 18 mg/mL e 9 mg/mL para as reações de H_2O_2 e NO

Os cimentos foram espatulados de acordo com as especificações do fabricante e deixados em câmara de fluxo laminar até atingir presa. A obtenção das soluções estéreis dos cimentos deu-se a partir das concentrações de 18 mg/mL¹² e 9 mg/mL de cada cimento sonificado (*Sonic & Materials*,

VibraCell) e diluído em polietileno glicol 400, esterilizados em autoclave, por 20 minutos, a 121 °C.

A partir dessas concentrações, foram realizadas diversas diluições em RPMI 1640-Completo, avaliando-se sua viabilidade celular em culturas de macrófagos peritoneais pela Técnica de Mossman⁸.

Reação de H_2O_2

Coleta e quantificação das células na reação de H_2O_2

Com seringa e agulha descartáveis e estéreis, introduziu-se 5,0 mL de solução salina tampão de fosfatos com pH 7,0 contendo NaCl 140 mM e 5,5 mM de dextrose na cavidade abdominal dos animais. Após massagem digital, aspirou-se com seringa e agulha esterilizadas a suspensão celular, que foi centrifugada.

Após centrifugação a 2.000 rpm/min por 5 minutos, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se às células 1,0 mL da solução tampão, procedendo-se novas homogeneização e centrifugação, procedimentos que foram repetidos por mais duas vezes. Da suspensão celular contendo 1,0 mL de solução salina, foram retirados 10 µL aos quais foram adicionados 90 µL de líquido de Lázarus em recipiente à parte e homogeneizados. Desses 100 µL, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara de Neubauer para contagem de células.

A seguir, tendo em consideração o número de células por mL, após nova remoção da solução salina, as células foram novamente suspensas ao volume original em solução tamponada de fosfato de pH 7,0, contendo 140 mM de NaCl, 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,1 mg/mL Sigma), para se obter a concentração desejada de células de $2,0 \times 10^6$ /mL. No grupo controle positivo, foi utilizada apenas a suspensão celular sem adição de cimentos, o Zimosan (Sigma, 2-4250) na concentração de 50 µl/cavidade, como controle comparativo da reação.

Preparação das culturas e adição de cimentos

M.T.T. - Tetrazólio - avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

Foi preparada uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma cod. M- 2128) a 5 mg/mL, em PBS, estocada no escuro a 4 °C, esterilizada em membrana tipo Millipore 0,22 µ no momento do uso a 1/5 mg/mL e diluída em meio RPMI 1640-Completo sem soro fetal bovino. Para o ensaio de viabilidade celular, foi utilizado o método baseado na capacidade que as células viáveis têm de poderem ser clivadas pelo anel tetrazólico presente no M.T.T. (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) pela ação das enzimas desidrogenases

presentes em sua mitocôndria ativa, formando cristais de formazana⁸.

A suspensão de células peritoneais utilizada foi ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI 1640-Completo⁸. Foram adicionadas várias concentrações dos diferentes cimentos sobre as células. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C com tensão constante de 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados sobre a cultura celular 100 µL de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2-5-difeniltetrazólio (M.T.T.) (Across Organics) diluído em tampão de PBS (1 mg/mL). Após incubação por mais 3 horas a 37 °C, foram descartados os sobrenadantes, vertendo-se a placa em papel absorvente, e, nas células ou tapete celular aderente, colocou-se 100 µL de álcool 2 propanolol/"wells" (Mallinckrodt, Xalostoc, México). Após 10 minutos para estabilização da reação e também para que a quantidade de Álcool 2-propanolol usada solubilizasse os cristais de formazana formados, procedeu-se então a leitura em espectrofotômetro UV/visível a 540 nm com filtro de referência a 620 nm⁸.

Cada cimento foi experimentado quatro vezes nas respectivas concentrações de 140 µg/mL, 70 µg/mL, 35 µg/mL e 17 µg/mL. Alíquotas de 100 µL da suspensão contendo as células foram transferidas para placas de culturas de tecidos (*Corning*), sendo acrescentados 50 µL das soluções dos cimentos separadamente. As placas foram incubadas a 37 °C a uma tensão de 5% de CO₂ por 1 hora. Posteriormente foram adicionados 50 µL de NaOH 5 N para interrupção da reação.

Análise da absorbância

Foram removidos 100 µL do sobrenadante e foi realizada leitura em leitor de ELISA automático (GENETIC SYSTEM) com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 5 N. Os resultados foram expressos em micromoles a partir de uma curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações nanomoles para o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Reação de NO

Coleta e quantificação das células na reação de NO

Com seringa e agulha descartáveis estéreis, introduziu-se 3,0 ml de solução tamponada de fosfatos a pH 7,2 (PBS) na cavidade abdominal dos animais. Aspirou-se o conteúdo líquido peritoneal, que foi centrifugado em tubo de centrifuga de 15 mL a 2000 rpm por 5 minutos. Em câmara de fluxo laminar, desprezado o sobrenadante, adicionou-se 1,0 mL de PBS para novas homogeneização e centrifugação, manobras estas repetidas mais duas vezes. Adicionou-se às células 1,0 mL de meio RPMI 1640-Completo (Sigma), contendo 100 U/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de

estreptomicina (Sigma), 2 µg de L glutamina (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab). Foram removidos 10 µL da suspensão contendo as células e acrescentados 90 µL de líquido de Lázarus, em recipiente à parte, e homogeneizados. Retirou-se 10 µL, e introduzidos numa câmara de Neubauer para a contagem das células, onde a suspensão celular foi ajustada a 5×10^6 células/mL para coleta e quantificação na reação de NO.

Preparação das culturas e adição de cimentos

Colocou-se 100 µL da suspensão contendo as células numa placa de cultura de tecido de 96 orifícios (*Corning*). Cada concentração do cimento foi experimentada quatro vezes, adicionando-se 100 µL de cada concentração em estudo na placa de cultura de tecidos contendo as células. A incubação foi feita a 37 °C a uma tensão de 5% de CO₂ por 48 horas. No grupo controle positivo foi utilizada apenas a suspensão celular equilibrada, sem adição de cimentos, empregando-se uma quantidade de 100 µL ou 0,1 mL de uma solução a 10 mg/mL de LPS da E. coli 026:B6 (Difco) como controle.

Análise da absorbância

Removeu-se 50 µL do sobrenadante das culturas celulares, que foram colocados em outra placa de *Corning*. Acrescentou-se 50 µL do reagente de Griess e, após 10 minutos de repouso à temperatura ambiente, fez-se a leitura em leitor de ELISA automático (ORGANON, READER 2001) com filtro 540 nm. Os resultados de cada ensaio, expressos em micromoles, foram comparados com os de uma curva padrão preexistente em cada ensaio, constituída de concentrações em micromoles conhecidas de NO.

Análise estatística

Foi realizada por meio do Programa *Graph Pad Instat*, aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas pelo teste de Tuckey.

Resultado

Estabelecidas as concentrações de cada um dos cimentos testados, foi feita a dosagem do NO liberado pelas culturas celulares em presença das amostras LPS (controle positivo) e do, somente, meio RPMI-C e polietilenoglicol (PEG) com controle de células da reação de Griess.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1 e na Figura 1.

A comparação da produção de NO pelas células estimuladas pelos cimentos e pelas células estimuladas com LPS mostrou uma produção de NO estatisticamente maior para o LPS, com $p < 0,001$.

O teste de liberação de peróxido de hidrogênio foi realizado utilizando-se culturas celulares em presença de

Zimosan (controle positivo) e somente meio RPMI-C e polietilenoglicol como controle de células na reação. Segundo os resultados obtidos e representados na Tabela 2 e na Figura 2, as células estimuladas com Zimosan mostraram uma maior liberação de peróxido de hidrogênio comparadas com as células estimuladas pelos cimentos, com $p < 0,001$.

Foi ainda realizada a determinação de NO e peróxido de hidrogênio em concentrações celulares variáveis, para posterior comprovação dos diferentes números de ajustes celulares, utilizando como referencial os grupos controle LPS e Zimosan-A.

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de diferentes concentrações dos cimentos testados

Óxido Nítrico - Cimentos			
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão
Endofill 35 μg	5	11,900	+ 1,129
Polifil 17 μg	5	12,452	+ 2,991
Sealapex 140 μg	5	2,452	+ 2,918
LPS	5	43,696	+ 5,6163
Poli 0,19%	5	0,604	+ 0,1848
Poli 0,098%	5	0,292	+ 0,1164
Poli 0,78%	5	0,172	+ 0,1173

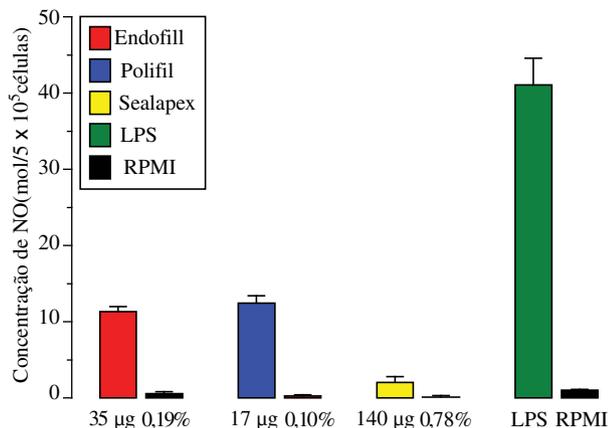


Figura 1. Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* machos em presença de diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Endofill, Polifil, Sealapex e LPS (controle positivo) nas concentrações de 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,19%, 0,10% e 0,78% de PEG como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) e os resultados expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células, como média \pm desvio padrão.

O ajuste celular para a realização do teste do NO é de 5×10^6 células. Nesse ajuste, pode-se observar a maior liberação do mediador.

Observando a concentração de 1×10^6 células, foi verificada uma concentração de NO estatisticamente significativa quando comparada com a de seu respectivo controle negativo ($p < 0,01$) e com o ajuste ideal de 5×10^6 células ($p < 0,001$).

Portanto, a Figura 3 demonstra que, em uma concentração cinco vezes menor, a liberação de NO atinge 62,6 μmol de nitrito e 83,4 μmol de nitrito na concentração ideal, evidenciados na Tabela 3.

Na determinação da liberação do peróxido de hidrogênio, a concentração celular ideal para a reação é de 2×10^5 células. Observando as concentrações celulares de 2×10^6 e

Tabela 2. Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de diferentes concentrações dos cimentos testados

Peróxido De Hidrogênio - Cimentos			
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão
Endofill 140 μg	5	11,672	+ 3,220
Polifil 140 μg	5	13,954	+ 7,857
Sealapex 140 μg	5	10,398	+ 2,362
LPS	5	111,608	+ 1,66464
Poli 0,78%	5	0,154	+ 0,09813
Poli 0,78%	5	0,652	+ 0,2008
Poli 0,78%	5	0,526	+ 0,2555

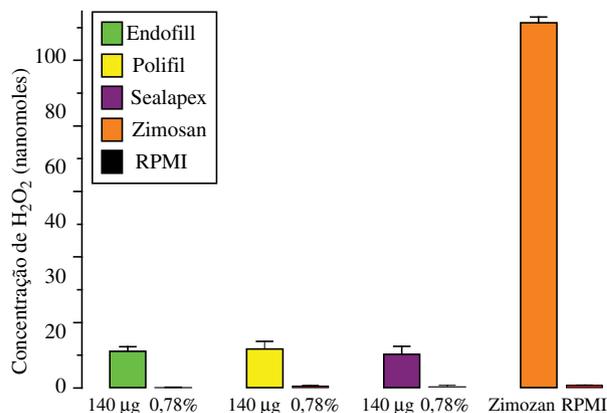


Figura 2. Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* machos em presença de diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença do Polifil, Endofill, Sealapex e Zimosan (como controle positivo) na concentração 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou somente meio RPMI 1640-Completo contendo 0,78% de PEG como controle. A concentração de H_2O_2 foi determinada através de uma reta padrão previamente estabelecida, como média \pm desvio padrão.

5×10^5 (Figura 4), confirma-se que não houve diferença significativa quando comparadas com a concentração de 2×10^5 células, mostrados na Tabela 4.

Discussão

Os níveis de H_2O_2 e NO determinados pela análise colorimétrica^{3,7,13,14} aumentam proporcionalmente a citotoxicidade^{7,15}, parâmetros esses que são utilizados para a avaliação da citotoxicidade auxiliando na compreensão da biocompatibilidade material/tecido hospedeiro^{11,21}. Contudo, não deve ser esquecido que a citotoxicidade^{5,11} é um subconjunto da biocompatibilidade²¹ e que ambos somente associados a outros parâmetros se pode extrapolar os resultados. Para o parâmetro NO, utilizando as concentrações de cada cimento que forneceu uma viabilidade maior que 50% das células do exsudato peritoneal, observamos que tanto o Endofill como o Polifil induziram maior liberação de NO ao redor de $12,0 \mu\text{mol}/5.10^5$ células, e o Sealapex $2,452 \mu\text{mol}/5.10^5$.

Para o parâmetro H_2O_2 , não houve uma equivalência em termos de H_2O_2 nas concentrações de $140 \mu\text{g/mL}$ tenham

efeito estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de significância. Entretanto as médias de liberação de H_2O_2 são cerca de cinco vezes menores que a média de liberação do controle positivo Zimosan-A. Como foram utilizadas concentrações de todos os cimentos nas quais a viabilidade celular mensurada pela citotoxicidade (M.T.T.)⁸ foi maior que 50%, procedeu-se a um experimento em que foram variadas as concentrações celulares e observou-se que ocorreu a liberação de NO e H_2O_2 quando os macrófagos foram expostos ao L.P.S. e ao Zimosan respectivamente).

Molnar⁶, levou em consideração que para os cimentos à base de OZE, outras investigações futuras devam ser feitas; por exemplo, sobre: processo de fabricação do óxido de zinco, tamanho de suas partículas, absorção pelo óleo, velocidade de incorporação e dispersão do Eugenol na manipulação manual, uniformidade nas formas das partículas, superfície homogênea das mesmas, sendo o Eugenol irritante só na quantidade de 5% livre e também depois de o cimento ter tomado presa e a sua afinidade com as camadas de lípidos da membrana celular das culturas de macrófagos esse cimento,

Tabela 3. Médias e desvio padrão dos valores de liberação de óxido nítrico em presença de LPS

Concentrações de NO - LPS			
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão
5×10^6 células	5	83,400	+ 10,065
RPMI-C	5	0,6560	+ 0,6282
1×10^6 células	5	62,600	+ 5,727
RPMI-C	5	0,4320	+ 0,4202
5×10^5 células	5	26,600	+ 2,881
RPMI-C	5	0,2480	+ 0,2590

Tabela 4. Médias e desvio padrão dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio em presença de Zimosan

Concentrações de Peróxido de Hidrogênio - Zimosan			
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão
2×10^6 células	5	160,75	+ 8,756
RPMI-C	5	0,2925	+ 0,2334
2×10^5 células	5	174,50	+ 9,434
RPMI-C	5	0,2350	+ 0,1967
5×10^5 células	5	144,25	+ 10,569
RPMI-C	5	0,3025	+ 0,2497

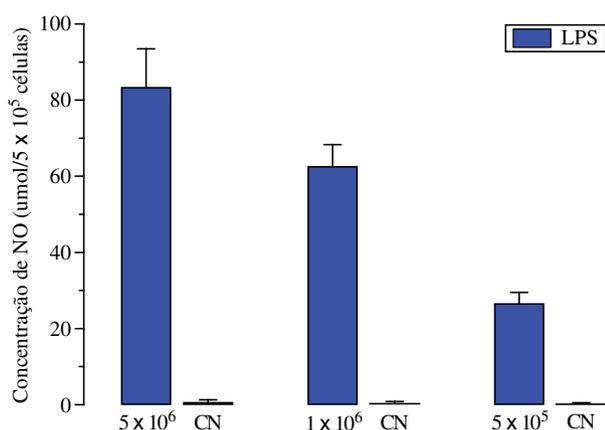


Figura 3. Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* machos em diferentes ajustes celulares em presença de LPS.

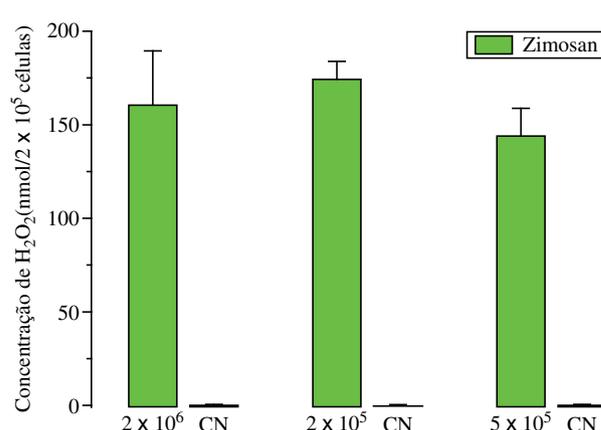


Figura 4. Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* machos em diferentes ajustes celulares em presença de Zimosan.

em baixas concentrações, poderia “provavelmente” diminuir sua citotoxicidade quando no contato celular.

Torabinejad et al.¹⁹ relataram em que cimentos à base de OZE contendo na sua formulação compostos à base de subcarbonato de bismuto são altamente agressivos aos tecidos celulares e células de defesa, o que pode provavelmente ocorrer onde concentrações endodônticas mais altas ou mais baixas, tenham provocado aumento de citotoxicidade em alguns resultados.

Pesquisas adicionais são necessárias para assegurar que os efeitos de tais materiais experimentados sejam completamente compreendidos. É preciso ainda considerar que existem limitações quando as informações científicas são obtidas pelo sistema de modelo de cultivo celular e os riscos de extrapolar os resultados para a clínica. Dessa forma, trabalhos visando as suas avaliações em outros níveis de pesquisa²⁰ e os seus resultados devem ser cuidadosamente extrapolados para uma situação in vivo, considerando ainda limitações inerentes ao tipo de animal, ao modelo experimental e às intercorrências naturais durante um tratamento endodôntico em humanos, embora as respostas dos macrófagos humanos dificilmente sejam diferentes das observadas nos macrófagos murinos derivados de camundongos^{1,2,4-6,16-19}.

Conclusão

- **NO** - em termos de produção média de óxido nítrico, segundo o teste de Tuckey ao nível de 5% de significância, os cimentos analisados podem ser colocados na seguinte ordem crescente: Sealapex < Endofill = Polifil < LPS, respectivamente nas concentrações de 140 µg/mL, 35 µg/mL, 17 µg/mL e 17 µg/mL do controle positivo LPS;
- **Peróxido de Hidrogênio** - Em relação à liberação de H₂O₂, não há evidência de que os cimentos analisados nas concentrações de 140 µg/mL, tenham efeitos estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de significância. Entretanto, as médias de liberação de H₂O₂ nas concentrações dos respectivos cimentos analisados são cerca de cinco vezes menores que a média de liberação do controle positivo Zimosan - A; e
- Concluiu-se que as considerações presentes após os resultados, discussão e constatação mostram que, utilizando variações de concentrações celulares para o NO e para o peróxido de hidrogênio, as menores viabilidades podem liberar significativas quantidades de NO e H₂O₂.

Referências

1. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000; 26: 462-5.
2. Egea SJJ, Rubio-Manzanares AJ. Los macrófagos peritoneales de rata como modelo celular in vitro para el estudio de la biocompatibilidad de los materiales odontológicos. *Operatoria Dental y Endodoncia.* 1998; 2: 1-6.
3. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções.* *Rev Assoc Med Brasil.* 2000; 46: 265-71.
4. Hang FM, Tai K-W, Chou M-Y, Chang Y-C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002; 35: 153-8.
5. Leonardo RT. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos, quanto à eração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos [Tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.
6. Molnar EJ. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res.* 1967; 46: 645-9.
7. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-42.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
9. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Consejo canadiense de protección de los animales, 1998 [citado em 2004 Jul 8]. Disponível em: <http://www.ccac.ca/guides/spanish/spantofc.htm>.
10. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived, relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-6.
11. Perassi FT. Liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNFα) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.
12. Perassi FT, Bonetti Filho I, Berbert FLCV, Carlos IZ, Leonardo RT. Secretion of tumor necrosis factor - alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, Sealapex and Endomethasone. *J Endod.* 2004; 30: 534-7.
13. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38: 161-70.
14. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods.* 1981; 46: 211-26.
15. Queiroz CES. Avaliação da citotoxicidade de cimentos

- endodônticos quanto à liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1997.
16. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *J Dent.* 1994; 22 (suppl. 2): 6-11.
 17. Spångberg L. Biological effects of root canal fillings materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water soluble substances on human cells in vitro. *Odontol Revy.* 1969; 20: 123-32.
 18. Tai K-W, Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod.* 2001; 27: 571-3.
 19. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995; 21: 489-92.
 20. Watts A, Paterson RC. Initial biological testing of root canal sealing materials: a critical review. *J Dent.* 1992; 20: 259-65.
 21. Williams DF. Biocompatibility: an overview. In: Williams DF. *Concise enciclopedia of medical and dental materials.* Oxford: Pergamon; 1990. p.51-9.

