

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE *in*
vitro DO IODOFÓRMIO E DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
EMPREGANDO - SE DOIS VEÍCULOS DIFERENTES

Rosângela Lustosa D'Ávila Pinheiro Daniel

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de
Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração : ENDODONTIA.

São Paulo
1998

Data da defesa: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

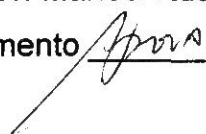
Profa. Dra. Márcia Martins Marques Jaeger

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

Julgamento  _____ Assinatura: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*
DO IODOFÓRMIO E DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
EMPREGANDO-SE DOIS VEÍCULOS DIFERENTES**

Rosângela Lustosa d'Ávila Pinheiro Daniel

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de
Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

SÃO PAULO

1998

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Daniel, Rosângela Lustosa D'Ávila Pinheiro

Análise comparativa da citotoxicidade *in vitro* do iodoformio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes / Rosângela Lustosa d'Ávila Pinheiro Daniel ; orientador Manoel Eduardo de Lima Machado. -- São Paulo, 1998.

200p. : il.

Dissertação (Mestrado -- Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

I. Medicação endodôntica intracanal

CDD 617.6342
Black D242

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, LIMÍRIO (*in memoriam*) e SUERDA, que não mediram esforços e sacrifícios para que eu pudesse realizar o curso de graduação em Odontologia, muitas vezes renunciando seus próprios desejos para que os meus fossem concretizados, não bastaria o meu agradecimento. Os seus exemplos de perseverança e determinação para ir sempre em frente, em que me espelhei inicialmente, serviram para refletir em mim a coragem e o desejo de jamais estagnar.

A WALDO EMERSON PINHEIRO DANIEL, meu marido, grande incentivador dos meus sonhos, que soube suportar as minhas angústias e inquietações, que me apoiou nas horas de maior necessidade, compreendendo as minhas constantes ausências para a realização deste trabalho, não bastaria o meu simples agradecimento. Sua força de vontade, sua capacidade de lutar e o seu exemplo foram o alicerce que me proporcionaram a estabilidade emocional para a construção dos meus sonhos e concretização de um dos meus ideais.

A fusão de duas células germinativas nos faz lembrar que o desejo de ser mãe está no âmago da mulher; a maternidade é um sonho adormecido que desperta a mais pura emoção e concretização dos nossos anseios. A sensação de que existe alguém dentro de nós é indescritível; nos estimula, nos dá alegria, impulsiona nossos pensamentos para a frente, para a conquista. Cada vez que senti os movimentos desse bebê enquanto escrevia esta dissertação, mais força eu tinha para continuar lutando no sentido de vencer o sono e o cansaço, ansiosa por concluir e, ao mesmo tempo, por ver se aproximar o dia em que traria o meu filho ao mundo. Hoje ele está aqui participando desse momento tão importante para mim.

Aos meus pais, a você, "meu lindo" e ao nosso filhinho,

Dedico os méritos que este trabalho possa vir a merecer.

Ao prof. Dr. MANOEL EDUARDO DE LIMA MACHADO,

Que me abriu as portas para a realização deste trabalho, quando concordou com a minha vontade de trabalhar com cultivo celular, início de todo o roteiro traçado para que o mesmo fosse finalmente concretizado. Pela maneira atenciosa com que sempre me atendeu e pelas valiosas orientações transmitidas, tanto do ponto de vista científico como clínico, as quais contribuíram para o enriquecimento deste estudo, sempre buscando esclarecer as dúvidas que surgiam durante o seu desenvolvimento,

Meu eterno agradecimento.

À prof. Dra. MÁRCIA MARTINS MARQUES JAEGER,

Que durante todo o desenvolvimento experimental deste trabalho conduziu a minha co-orientação e, cujo incentivo, perseverança e objetividade foram pedras fundamentais para o alicerce deste trabalho, sabendo discernir, em seu "instinto maternal", até em que momento era preciso nos dar asas para que pudéssemos voar sozinhas, no caminho da pesquisa, procurando solucionar as dúvidas que surgiam durante a fase laboratorial, sem, no entanto, deixar de nos orientar nas horas em que achávamos que não íamos conseguir,

Minha profunda gratidão.

HOMENAGEM ESPECIAL

À Prof. Dra. REJANE ANDRADE DE CARVALHO (UFRN),

que desde o início, quando éramos aluna e professora, me ensinou muitas coisas. Primeiro, aprendi um pouco da nossa Endodontia, lá mesmo no interior, onde realizei meu estágio obrigatório, ainda como aluna da graduação. Depois, fui aprimorando meus conhecimentos no Curso de Aperfeiçoamento sob sua Coordenação e em seu consultório. Então, tive a oportunidade de fazer o I Curso de Especialização na UFRN. Por trás de tudo o que aprendi, uma pessoa sempre esteve presente, guiando e orientando meus passos, me ensinando um pouco de tudo, desde o conhecimento teórico-prático da Endodontia, até o aprendizado da vida. Essa pessoa é você, Rejane. Você foi e sempre será um exemplo marcante de que com humildade e no momento certo as coisas acontecem para nós. Paciência, perseverança, dinamismo e amor à Endodontia são os seus lemas. Acho que você tem razão quando diz que algum dia já fomos irmãs. Nossos pensamentos se direcionam sempre no sentido de viver mais e melhor. Em nossos corações existe a vontade de passar para adiante o que aprendemos - isso aprendi com você. Poucos são os que compreendem a grandeza do seu coração e a sua vontade e garra de ensinar. E é por isso que neste trabalho não poderia deixar de homenageá-la, pois para que eu chegasse até aqui foi muito importante o seu incentivo, respeito, amizade e, principalmente, seus ensinamentos.

Meu reconhecimento e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e Faculdade de Odontologia, responsáveis pela minha formação básica e pelo curso de especialização em Endodontia.

Aos meus irmãos Luiz, Bá e Inha e, especialmente, a Cristina e Miro, gostaria de agradecer pelo apoio constante nas horas em que precisei durante a minha ausência e que jamais esquecerei.

Ao Sr. Emerson e D. Francisca (meus sogros), cujo apoio constante, palavras de incentivo, força e solidariedade transmitidos para que eu atingisse essa meta foi muito importante. Agradeço de todo coração e fiquem certos que parte de vocês também está neste trabalho.

Ao prof. Darce Freire Dantas de Araújo (UFRN) pela minha recomendação para realização do curso de Mestrado em Endodontia da Universidade de São Paulo.

Ao prof. Ocilene Guedes (UFRN) pela indicação e liberação de minhas atividades para concretização deste curso.

Aos profs. Drs. José Seabra de Melo e Helson José de Paiva (UFRN), por tornarem possível a minha integração à Faculdade de Odontologia e minha posterior liberação para realização deste curso de Mestrado.

Ao prof. Dr. João Humberto Antoniazzi, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Endodontia, cuja humildade e simplicidade me fez sentir que fiz a escolha certa no momento em que decidi realizar o Mestrado em Endodontia da FOU SP, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência ao ensinar, pela dedicação aos seus alunos e pela colaboração na realização e interpretação da análise estatística deste estudo.

Ao Prof. Dr. Hidelberto Francisco Pesce, Vice-Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Endodontia, pelo enriquecimento científico proporcionado durante o decorrer do curso.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela maneira atenciosa como nos acolheram durante o desenvolvimento das aulas e seminários, propiciando novos conhecimentos ao nosso arsenal endodôntico.

À Neusa pela constante dedicação e colaboração nos momentos em que chegávamos, sempre em caráter de "urgência" solicitando os seus serviços profissionais.

Aos meus colegas de turma, Arlindo, Elaine, Fábio, Mary Caroline, Selma e aos "agregados" Ary, Lúcio e Míriam, e, especialmente a Letícia, e Suely, cuja convivência foi um misto de cumplicidade, companheirismo e estímulo durante todo o curso, principalmente nos momentos em que participávamos dos famosos "torpedos culturais". Não posso deixar de dizer o quanto senti quando terminamos os créditos, pois cada um seguiu o seu caminho e isso fez com que nos encontrássemos apenas esporadicamente. Tenho certeza de que sempre lembrarei de vocês com muito carinho e espero um dia revê-los nos palcos da Endodontia.

Ao prof. Dr. Ney Soares de Araújo e Prof. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, pelo ambiente acolhedor proporcionados, pela agradável convivência durante a pesquisa e pela oportunidade de concretizar este trabalho.

Aos colegas da Patologia, Aymann, Costinha, Cristiane, Cristina, Flávio, Guilherme, Lélia, Luciana, Manoela, Ricardo, Rogério, Paulo e Sandra, pela agradável e carinhosa convivência e colaboração nos momentos que precisei para a concretização da parte experimental deste trabalho e, em especial, à Elaine Santos, com quem caminhei desde o início dos experimentos, pelo estímulo que nos dávamos nas ocasiões em que achávamos que a gente não ia conseguir realizá-lo - enfim, Elaine, conseguimos!

Às funcionárias da Patologia, Bia, Edna, Elisa, Nair, Néa e Zilda, pela forma atenciosa e simpática com que sempre nos receberam durante a fase de execução do experimental.

Às bibliotecárias Lucila, Suely e Vânia pela contribuição para a localização de artigos e pela correção das referências bibliográficas.

Aos funcionários responsáveis pela xerografia e reprodução, Flávio, Kate, Luciana, Rinaldo e Suely, pela dedicação, paciência e serviços prestados durante a elaboração deste trabalho.

Ao Sr. José Campos da Costa, pela colaboração na duplicação do material fotográfico e pela paciência com que sempre nos atendeu.

Àqueles que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a concretização deste trabalho e, cujos nomes, por um lapso de memória, não mencionei.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	p.
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO	001
2. REVISÃO DA LITERATURA	005
2.1. Iodofórmio	014
2.2. Hidróxido de cálcio	045
2.3. Veículo	080
2.4. Estudos <i>in vitro</i>	083
3. PROPOSIÇÃO	106
4. MATERIAL E MÉTODOS	107
4.1. Material	107
4.2. Métodos	109
5. RESULTADOS	118
6. DISCUSSÃO	149
7. CONCLUSÕES	174
ANEXOS	175
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184
SUMMARY	
APÊNDICES	

LISTA DE FIGURAS

p.

Figura 1 - Fotografia do hemocitômetro ou câmara de Neubauer utilizada para contagem do número de células viáveis e mortas. Detalhe de uma das câmaras (★) onde é gotejada a suspensão celular (seta) 111

Figura 2 - Fotografia do hemocitômetro visto ao microscópio invertido de fase. Detalhe de uma célula morta (M) corada em azul e de uma célula viável (V) não corada. Cada câmara contém 25 quadrados (□). Dentro de cada quadrado contamos e registramos o número de células vivas e mortas, para posterior realização das curvas de crescimento e de viabilidade celular (x100) 111

Figura 3 - Fotografia de placas de Petri onde fibroblastos foram cultivados em meio de cultura (DMEM). Detalhe de lamínulas de vidro contendo a substância testada (setas) 115

Figura 4 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII e GIII, (resposta celular imediata ou de curto prazo) 121

Figura 5 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GIV e GV (resposta celular imediata ou de curto prazo) 122

Figura 6 - Cultura de fibroblastos 3T3 confluyente (0 hora - Iodofórmio + PEG 400); células fusiformes e que, independente da droga ou veículo utilizado, apresentou o mesmo aspecto microscópico para todos os grupos (x100) 123

Figura 7 - Halo de inibição ($\longleftrightarrow$) próximo à substância e células mortas (seta) com aspecto arredondado, muitas se soltando do substrato. Esse aspecto foi observado após 12 horas nos grupos GIV (iodofórmio + carbowax), GV (iodofórmio + PEG 400), GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400) (x100) 123

Figura 8 - Cultura em regiões mais afastadas da lamínula com a droga (24 horas). Podemos observar a permanência de algumas células de aspecto fusiforme (F) ainda aderidas ao substrato, de permeio a várias células arredondadas, mortas (A) que estão se soltando (grupo GIV - iodofórmio + carbowax) (x200) 124

Figura 9 - Cultura em regiões mais afastadas da lamínula com a droga (24 horas). Todas as células arredondadas, a maioria solta do substrato, mortas (grupo GV - iodofórmio + PEG 400) (x200) 124

Figura 10 - Aspecto observado, após 24 horas, nos grupos GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400), mostrando a recuperação das células perdidas com o preenchimento do halo de inibição com células vitais de aspecto fusiforme (setas) (x200) 125

Figura 11 - Aspecto observado, após 24 horas, nos grupos GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400). À distância da lamínula, as células continuam de aspecto fusiforme e confluentes, mesmo perto de fragmentos da pasta (setas) (x100) 125

Figura 12 - Curvas da porcentagem de viabilidade em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GVI e GVII, (resposta celular imediata ou de curto prazo) 126

Figura 13 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GIV e GVI, (resposta celular imediata ou de curto prazo) 127

Figura 14 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVII (resposta celular imediata ou de curto prazo) 128

Figura 15 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII, GIII e GIV, (sobrevivência a longo prazo) 130

Figura 16 - Fotografia ilustrando o crescimento de fibroblastos NIH 3T3 (PEG 400). Após 1 dia do plaqueamento e colocação da substância, observa-se, em todos os grupos, poucas células, de aspecto fusiforme ou estrelário (F) e, muitas células em divisão (setas). No canto superior direito observa-se parte da lamínula (L) (x200) 132

Figura 17 - Após 3 dias (PEG 400) do plaqueamento há um maior número de células; a cultura está em subconfluência e os aspectos morfológicos são similares aos da Figura 16 (x200) 132

Figura 18 - Após 7 dias (carbowlax) do plaqueamento, a cultura apresenta-se confluyente para todos os grupos, com grande número de células fusiformes e poucas células estão em divisão (seta) (x200) 133

Figura 19 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$), em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GV e GVI (sobrevivência a longo prazo) 134

Figura 20 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 1 dia, observa-se halo de inibição ao redor da lamínula de vidro contendo a substância (seta), com células mortas (M) e, mais afastado da lamínula, células aderidas ao substrato (*) ($\times 100$) 134

Figura 21 - Culturas tratadas com iodofórmio + PEG 400 (GVI). Após 1 dia, as células têm aspecto estrelário (*) e estão aderidas ao substrato em meio aos fragmentos da pasta, semelhante ao iodofórmio + carbowax (GV) ($\times 100$) 135

Figura 22 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVI, (sobrevivência a longo prazo) 135

Figura 23 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 5 dias algumas áreas estão preenchidas com células de aspecto fusiforme e células em divisão (seta) ($\times 100$) 136

Figura 24 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 7 dias, a cultura apresenta células com alterações morfológicas indicativas de degeneração, representadas por células multinucleadas (*) e granulações ou vesículas intracitoplasmáticas na região perinuclear (setas). Apenas algumas áreas apresentam este aspecto com células (x200) 136

Figura 25 - Culturas tratadas com iodofórmio + PEG 400 (GVI). Após 3 dias, o número de células não aumentou (x200) 137

Figura 26 - Culturas tratadas com iodofórmio + PEG 400 (GVI). A partir do dia 5 são poucas as células que permanecem aderidas à placa de Petri (x100) 137

Figura 27 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GVII e GVIII (sobrevivência a longo prazo) 138

Figura 28 - Poucas células de aspecto fusiforme nas culturas tratadas com hidróxido de cálcio + carbowax (GVII) e hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII), de permeio à substância (seta) que se difundiu na placa de Petri. Essa difusão foi mais encontrada quando o veículo utilizado foi o PEG 400. Aspecto 1 dia após (x200) 139

Figura 29 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVII (sobrevivência a longo prazo) 140

Figura 30 - Após 3 dias encontra-se um halo de inibição contendo células mortas (M), mas também com muitas células aderidas (A) e em divisão (D), tanto nas culturas tratadas com hidróxido + carbowax (GVII), como com hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII) ($\times 200$) 140

Figura 31 - Nas culturas tratadas com hidróxido + carbowax (GVII) e hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII), após 7 dias, independente do veículo utilizado, todas as culturas confluíram e o halo de inibição foi preenchido com células de aspecto fusiforme (*) ($\times 100$) 141

Figura 32 - Curvas de crescimentos celulares, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GVI e GVIII (sobrevivência a longo prazo) 142

Figura 33 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII, GIII e GIV (sobrevivência a longo prazo) 144

Figura 34 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GV e GVI, (sobrevivência a longo prazo) 145

Figura 35 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GVII e GVIII (sobrevivência a longo prazo) 146

Figura 36 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVII (sobrevivência a longo prazo) 147

Figura 37 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GVI e GVIII (sobrevivência a longo prazo) 148

LISTA DE TABELAS

p.

TABELA 5.1 - Valores da média e erro da média correspondentes à porcentagem de viabilidade celular, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de curto prazo 120

TABELA 5.2 - Comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular, para o experimento de curto prazo, segundo os diferentes tempos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 12,60596 121

TABELA 5.3 - Valores da média e erro da média correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$), distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de sobrevivência a longo prazo 129

TABELA 5.4 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores transformados dos números de células viáveis ($\times 10^4$), para o experimento de longo prazo, nos diferentes períodos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 0,13356 131

TABELA 5.5 - Valores da média e erro da média correspondentes à porcentagem de viabilidade celular, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de longo prazo 143

TABELA 5.6 - Comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidades celulares, para o experimento de longo prazo, nos diferentes períodos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 14,69341 144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEG 400 - polietileno glicol 400

s - significante

ns - não significante

CO₂ - dióxido de carbono

pH - potencial hidrogeniônico

mm - milímetro

kD - quilodalton

g - gramas

P_{5%} - probabilidade ao nível de significância de 5%

°C - graus centígrados

ml - mililitro

mm² - milímetro quadrado

cc - centímetro cúbico

mg - miligrama

DMSO - di-metil-sulfóxido

DMEM - Dulbecco's modified essential medium

cm² - centímetro quadrado

P.A. - pró-análise

PBSA - solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio

NIH - National Institute of Health

LPS - lipopolissacarídeo

⁵¹Cr - cromo radioativo

DNA - ácido desoxirribonucleico

Nº - número

LISTA DE SÍMBOLOS

- x100 - aumento de 100 vezes
- x200 - aumento de 200 vezes
- % - porcentagem
- α - nível de significância
- $\leq$ - menor ou igual
- = - sinal de igualdade

RESUMO

ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO IODOFÓRMIO E DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EMPREGANDO-SE DOIS VEÍCULOS DIFERENTES

A reação de fibroblastos NIH 3T3 Swiss às pastas de iodoformio e de hidróxido de cálcio associados a dois veículos diferentes foi avaliada por meio de ensaios de viabilidade pela exclusão de células coradas pelo azul de Trypan. Com o objetivo de avaliar a resposta celular imediata ao contato com essas pastas, na primeira etapa do estudo, fibroblastos foram plaqueados na densidade de 2×10^4 células por placa de Petri de 60mm de diâmetro. Após 3 dias, culturas confluentes receberam lamínulas de vidro, pinceladas com as substâncias a serem testadas. Como controle foram utilizadas lamínulas de vidro sem substância. Após 0, 6, 12 e 24 horas do contato inicial com a pasta, culturas controle e tratadas foram tripsinizadas e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Na

segunda etapa do estudo, para verificar o efeito de tais substâncias sobre o crescimento e a proliferação celular, fibroblastos foram plaqueados na densidade de 1×10^4 células por placa de Petri. Após 4 horas, estas culturas receberam lamínulas de vidro pinceladas com as substâncias. Como controle foram utilizadas lamínulas de vidro sem substância. Após 1, 3, 5 e 7 dias do contato inicial com a pasta, as culturas controle e tratadas foram tripsinizadas e as células contadas em câmara de Neubauer, fornecendo dados para as curvas de crescimento e viabilidade celular. Os resultados revelaram que, em curto prazo, não houve diferença estatisticamente na porcentagem de viabilidade celular entre os veículos e entre os grupos controle, hidróxido de cálcio/carbowax e hidróxido de cálcio/PEG 400. Por sua vez, o iodofórmio associado aos mesmos veículos, após 24 horas, causou a morte da maioria das células. A longo prazo, a viabilidade celular do hidróxido de cálcio associado a qualquer dos veículos foi semelhante àquela do grupo controle. Relativo à proliferação celular, após 7 dias, houve estabilização do número de células viáveis para o hidróxido de cálcio/PEG 400, porém, quando o veículo utilizado foi o carbowax, as células continuaram a proliferar semelhante ao grupo controle. O iodofórmio/carbowax mostrou proliferação celular até o quinto dia, mostrando baixo número de células e a viabilidade celular caiu para $28,004 \pm 6,48\%$ após 7 dias. O iodofórmio/PEG 400, a partir do terceiro dia, mostrou inibição da proliferação celular e, após 5 dias, a cultura praticamente não apresentava células viáveis ($5,533 \pm 0,682\%$). Os resultados mostraram que, independentemente do veículo utilizado o hidróxido de cálcio mostrou não

ser citotóxico. Por outro lado, o iodofórmio apresentou diferentes níveis de citotoxicidade. Quando associado ao carbowax, essa substância apresentou-se menos agressiva às células comparada ao iodofórmio associado ao PEG 400.

1. INTRODUÇÃO

A etiologia dos processos patológicos situados na região apical está associada, dentre outros fatores, aos microrganismos e suas toxinas presentes no interior do canal radicular de dentes com polpa morta e sua inter-relação com os meios biológicos de defesa presentes no periápice. Dependendo do equilíbrio que se estabelece entre eles, a patologia periapical evoluirá para a forma aguda ou crônica. Dessa forma, o tratamento endodôntico objetiva, por meio do preparo químico-cirúrgico, a limpeza, desinfecção e modelagem do canal radicular. Portanto, essa etapa da terapia é fundamental na tentativa da eliminação dos microrganismos, bem como de suas toxinas, permitindo que os elementos biológicos de defesa atuem no sentido de reparar a lesão existente.

Assim sendo, frente a lesões periapicais crônicas, a abordagem referente aos procedimentos a serem executados tem evoluído num sentido conservador, aproveitando o fato de que a maioria das alterações patológicas presentes nessa região, regride com a terapia endodôntica convencional. Contudo, fatores locais, tais como: bactérias persistentes no canal radicular, procedimentos endodônticos incorretos,

instrumentos fraturados, obturações radiculares parciais e sobreobturações, podem contribuir para o insucesso da terapia. Além disso, não poderíamos deixar de salientar os fatores sistêmicos, em geral associados a deficiências imunológicas.

No entanto, mesmo após execução dos recursos endodônticos tradicionais algumas patologias apicais não regredem. Da análise da literatura (Tronstad et al., 1990; Mölven et al., 1991) pôde-se observar que áreas de reabsorção externa da raiz, fruto de alterações inflamatórias preexistentes, podem acomodar diferentes espécies bacterianas que, dependendo da população e da sua adaptação, podem persistir nessa região, independentemente das reações de defesa do organismo. Este fato pode ser decorrente dessa ser uma área de difícil acesso aos mecanismos de defesa imunológicos. Assim sendo, essas infecções não são atingidas com a eficácia necessária para sua completa regressão, quando do tratamento endodôntico convencional, constituindo-se dessa maneira, capítulo à parte, o qual denominamos hoje "lesões refratárias".

Para o tratamento dessas entidades, procedimentos devem ser realizados, não se limitando apenas ao interior dos canais radiculares, mas, valendo-se do uso de fármacos que exerçam ação eficaz também na região apical, com o objetivo de favorecer a desinfecção e permitir a reparação periapical. Dentre os recursos clínicos empregados para esta terapêutica destacam-se o iodofórmio e o hidróxido de cálcio. Claro está que o seu emprego tem por finalidade complementar a ação da desinfecção do canal radicular e não substituir as fases anteriores da terapia endodôntica.

No que se refere ao hidróxido de cálcio, o mesmo pode ter seu uso associado ao polietileno glicol, com o objetivo de facilitar suas aplicações clínicas, sendo suas indicações sempre associadas às suas propriedades bactericida, anti-inflamatória e estimuladora da reparação.

Todavia quando da análise da literatura pertinente e dos resultados clínicos obtidos, há muito o iodofórmio tem seu uso aplicado na Endodontia (Sarrazin, 1924; Sturridge, 1924; Walkhoff, 1928; Agostini, 1934; Castagnola & Orlay, 1952; Iglesias et al., 1965; Maisto, 1965; Guedes-Pinto et al., 1981). Suas indicações estão associadas à presença de grandes áreas de reabsorções apicais, entretanto, apesar dos excelentes resultados clínicos, existem divergências entre os autores quanto a sua utilização. Essas preocupações estão baseadas na sua propriedade de liberar iodo e este poder induzir algum tipo de reação adversa. Contudo, tal fato carece de base científica, uma vez que não existem relatos na literatura, da ocorrência de reações de hipersensibilidade quando do uso desta substância como medicação intracanal, nos últimos 150 anos. Claro está que novos ensaios com metodologias modernas devam ser realizados, no sentido de se esclarecer o controvertido mecanismo de atuação desta droga. Essas preocupações são reembasadas pelo alto sucesso clínico que a mesma traduz.

A avaliação da biocompatibilidade dessas drogas é de suma importância, dado o fato de que elas são aplicadas na região apical, podendo apresentar um possível efeito lesivo sobre as células vivas dessa região. A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade

celular, constitui o primeiro passo para avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e, mesmo apresentando limitações, se forem cuidadosamente interpretados, poderão fornecer elementos importantes para análise da biocompatibilidade dos diferentes materiais.

Baseados nesses dados resolvemos fazer uma análise comparativa *in vitro* da citotoxicidade do iodofórmio e do hidróxido de cálcio associados a dois veículos diferentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O tratamento dos canais radiculares surgiu, inicialmente, com a finalidade de aliviar a dor de origem dentária, instituindo-se a extirpação pulpar como terapêutica para as pulpites. A partir de então, a endodontia era praticada empiricamente, sem bases sólidas. Uma vez que não se sabia ainda da importância dos microrganismos em Endodontia, os mais variados materiais eram empregados para o preenchimento da cavidade pulpar.

Quando tornou-se evidente a existência de microrganismos no interior dos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, após trabalho realizado por Miller (1894), o principal objetivo dos endodontistas foi direcionado na busca incessante de uma medicação intracanal que fosse capaz de destruir os microrganismos. No entanto, essas substâncias eram, na sua maioria, germicidas, porém, destituídas de seletividade. Portanto, causavam maior ou menor destruição tanto sobre bactérias como sobre células orgânicas, prejudicando o reparo periapical, o que levou os pesquisadores a se interessarem pela análise das drogas e técnicas utilizadas em Endodontia.

Foi então que iniciaram-se os estudos enfatizando a importância do preparo químico-cirúrgico para a obtenção do saneamento do canal radicular, o que levou os endodontistas a reavaliarem a necessidade da medicação intracanal. Nessa ocasião surgiram os tratamentos endodônticos realizados em uma única sessão. No entanto, a constatação de inúmeros casos de insucesso obtidos após a terapia endodôntica, favorecendo a manutenção das lesões periapicais, determinaram a realização de novos estudos com a intenção de definir a etiologia dessas lesões persistentes.

Ao longo dos anos surgiram relatos conflitantes a respeito da presença e do papel dos microrganismos extra-radiculares. Assim sendo, Boyle (1934) demonstrou, histologicamente, a presença de amplo número de bacilos Gram-positivos no interior de células fagocitárias na porção central de um granuloma dental.

Por sua vez, Andreasen & Rud (1972) utilizando uma técnica histobacteriológica em lâminas obtidas de 66 biópsias de lesões apicais e periapicais, observaram que, apenas em 2 casos, cujos ápices radiculares estiveram circundados por longo período por cistos infectados, o cemento estava necrótico e invadido por bactérias. E, exceto em 3 casos, não conseguiram visualizar nenhuma bactéria no interior de granulomas periapicais, mesmo que estes mostrassem inflamação severa ao exame histológico.

A importância e o papel dos microrganismos na patogênese das lesões periapicais estão bem estabelecidos. Nesse sentido, Möller et al.

(1981), avaliaram a relação entre o tecido pulpar necrosado e os tecidos periapicais; estudaram a possibilidade de manter o tecido pulpar necrosado, não infectado, no canal radicular durante um período de, no mínimo, 6 meses; e, analisaram as principais alterações na flora microbiana presente no canal radicular por 6 meses, além da sua capacidade de induzir a periodontite apical. Para o estudo as polpas de 78 dentes de 9 macacos foram necrosadas assepticamente. Vinte e seis câmaras pulpares foram mantidas livres de bactérias por meio de selamento, enquanto 52 foram infectadas pela flora indígena. Os resultados foram registrados clínica, radiográfica e microbiologicamente, no início do experimento e após 6-7 meses. Os autores observaram que todos os canais radiculares inicialmente não infectados apresentavam-se estéreis nas amostras finais, indicando que o risco de contaminação (incluindo a hematogena) dos canais radiculares é muito leve. Também foi mostrado que o tecido pulpar necrosado não infectado não induziu reações inflamatórias nos tecidos apicais. Em contraste, dentes com tecido pulpar infectado mostraram reações inflamatórias radiograficamente. As espécies bacterianas mais encontradas foram estreptococos anaeróbios facultativos, bastonetes coliformes e anaeróbios obrigatórios. Nas amostras finais o número de espécies anaeróbias obrigatórias aumentou. Alguns microrganismos que foram isolados das amostras iniciais não foram detectados nas amostras finais e, todos os dentes infectados, examinados histologicamente, mostraram fortes reações inflamatórias na região periapical.

Paiva & Antoniazzi (1993) relataram que estímulos sediados no interior do canal radicular, quer seja toxinas microbianas, produtos tóxicos oriundos da degradação do tecido vivo e ação tóxica de certas substâncias químicas, poderiam desencadear a reação inflamatória. Isso ocorreria toda vez que esse estímulo ultrapassasse a capacidade de tolerância fisiológica dos tecidos que compõem o periápice. Os autores também relataram que após adequado tratamento endodôntico, com a remoção da fonte de infecção, a reparação periapical deveria ocorrer.

As tentativas de identificar microrganismos significantes para a *patogênese das lesões periapicais eram falhas devido à contaminação bacteriana durante a coleta do material ou técnicas de culturas inadequadas.* Dessa forma, com o objetivo de estudar a flora endodôntica e periapical de dentes humanos, ao microscópio de luz e eletrônico, Ramachandran Nair (1987) analisou 31 lesões periapicais humanas (30 granulomas e 1 cisto radicular) de dentes extraídos que não receberam tratamento endodôntico. Os resultados mostraram que todos os dentes apresentavam bactérias em seus canais radiculares, consistindo de cocos, bastonetes, organismos filamentosos e espiroquetas. Mas, apenas 5 espécimes revelaram bactérias no corpo das lesões, sendo que tais lesões eram agudas e sintomáticas.

A fim de verificar a presença de bactérias, Tronstad et al. (1987) examinaram 8 lesões periapicais inflamatórias, assintomáticas, as quais eram refratárias à terapia endodôntica convencional. Desses 8 casos, 3 foram retratados sem sucesso e 5 não foram retratados devido à presença de pinos intra-radiculares. As lesões periapicais foram removidas

cirurgicamente, sob condições assépticas, e as amostras bacteriológicas foram transportadas em meio de Möller VMGA III e processadas usando técnica anaeróbia contínua. Foi evidenciado crescimento bacteriano de anaeróbios nas amostras das 8 lesões. Em 2 lesões observou-se exclusivamente anaeróbios e em 5 lesões predominavam anaeróbios, mostrando que os anaeróbios são capazes de sobreviver e manter um processo infeccioso nos tecidos periapicais.

Utilizando técnica bacteriológica anaeróbia, Byström et al. (1987) mostraram que as bactérias de canais radiculares infectados eram eliminadas antes da conclusão do tratamento endodôntico pela obturação do canal. Nesses casos, após 2-5 anos houve reparo das lesões periapicais. A maioria das 79 lesões reparou completamente ou diminuiu de tamanho. Em 5 casos houve nenhuma ou apenas insignificante redução no tamanho das lesões. Duas destas lesões continham bactérias das espécies *Actinomyces* ou *Arachnia*. Outro caso revelou fragmentos de dentina no tecido periapical. Este estudo mostrou que, apesar do tratamento endodôntico, a não reparação de lesões periapicais poderia ser devido, em alguns casos, ao estabelecimento de bactérias fora do canal radicular, nos tecidos periapicais, onde as bactérias são inacessíveis ao tratamento endodôntico convencional.

Com a finalidade de avaliar o conteúdo bacteriano dos granulomas periapicais, Iwu et al. (1990) realizaram um estudo, utilizando técnica de amostragem e métodos de cultura de anaeróbios. Dos 16 granulomas periapicais avaliados, 14 (88%) produziram crescimento positivo quando homogeneizados e cultivados. Um total de 47 isolamentos foi obtido,

incluindo 26 (55%) de anaeróbios facultativos e 21 (45%) de anaeróbios estritos. Os organismos mais comumente cultivados foram as espécies *Veillonella* (15%), *Actinomyces naeslundii* (11%), *Streptococcus milleri* (11%), *Streptococcus sanguis* (11%), *Propionibacterium acnes* (11%) e *Bacteroides* (10%). A maioria dos organismos foi sensível ou à amoxicilina, clindamicina ou tetraciclina, enquanto apenas 45% foi sensível ao metronidazole. Os resultados tendem a apoiar a visão de que microorganismos viáveis do tecido pulpar necrótico difundem-se e colonizam parte dos tecidos periapicais, invocando resposta inflamatória crônica. É possível que as bactérias tenham sido introduzidas nos tecidos periapicais, via canal radicular, uma vez que os pacientes investigados neste estudo tinham recebido terapia endodôntica antes de serem submetidos à cirurgia.

Tronstad et al. (1990) examinaram, microscopicamente, a superfície de ápices radiculares de 10 dentes infectados, os quais foram removidos cirurgicamente, sob condições assépticas. Todos os dentes apresentavam lesão periapical que não regrediram após tratamento endodôntico prévio, sendo que 5 casos apresentavam-se com fístula. Quatro pacientes foram retratados sem sucesso e seis pacientes não foram retratados devido à presença de pinos ou restauração protética extensa. A lesão foi exposta sob cirurgia parendodôntica asséptica, realizou-se uma incisão no centro da lesão e amostras de bactérias foram colhidas utilizando-se cones de papel. As amostras foram colocadas em tubos com meio de Möller VMGA III e processadas usando técnicas aeróbias e anaeróbias. Além disso, foi feita a apicectomia de cerca de 2 a 3mm das raízes, as quais

foram fixadas em formalina a 10% tamponada e processada para estudo em microscópio eletrônico. Os resultados revelaram a predominância de anaeróbios em todas as amostras e a presença de placa bacteriana em diversas áreas da raiz, dominada por cocos, bastonetes e organismos filamentosos com cocos aderidos a sua superfície.

Tronstad et al. (1990) descreveram um caso onde o tratamento de um dente com periodontite apical assintomática foi insatisfatório, devido ao estabelecimento de infecção extra-radicular na lesão periapical, que poderia ser apenas parcialmente influenciada pelo tratamento antimicrobiano local e sistêmico. A efetividade deste tratamento foi monitorizada pela amostra microbiológica do canal radicular, de um trato fistuloso e diretamente da lesão periapical. Os resultados mostraram que predominaram bactérias anaeróbias em todas as amostras e foram fortemente sugestivos de infecção extra-radicular estabelecida. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a presença de placa bacteriana na superfície do ápice radicular removida ao final do tratamento endodôntico e cirúrgico. Após obturação, apicectomia e remoção da lesão periapical houve o reparo com neoformação óssea na cavidade cirúrgica após 6 meses.

Utilizando microscopia de luz e eletrônica, Ramachandran Nair et al. (1990) analisaram 9 lesões periapicais humanas assintomáticas resistentes ao tratamento endodôntico. Os espécimes foram removidos por biópsia, em bloco, durante o tratamento cirúrgico dos dentes afetados. Os casos que necessitaram cirurgia representaram cerca de 10% de todos os

casos que receberam tratamento endodôntico e obturações do canal radicular num período de 7 anos. Os resultados revelaram que 6 das 9 biópsias apresentavam microrganismos na região apical do canal radicular, sendo que 4 continham uma ou mais espécies de bactérias e 2 revelaram leveduras. Dos 4 casos contendo bactérias, apenas em 1 essas puderam ser visualizadas ao microscópio de luz. Nos outros 3 espécimes, a presença de bactérias só foi confirmada após repetidos exames da porção apical do canal, pela técnica do corte seriado. Dos 3 casos onde microrganismos não foram encontrados, apenas um mostrou aspecto histopatológico de granuloma de células gigantes tipo corpo estranho. Estes achados sugerem que, na maioria dos dentes humanos com canais radiculares obturados e com lesões periapicais resistentes ao tratamento, podem persistir microrganismos, os quais desempenham um papel significativo no insucesso do tratamento endodôntico. Certas vezes, tais lesões podem também ser mantidas pelas células gigantes tipo corpo estranho de respostas teciduais, no periápice de dentes com canal radicular obturado.

Por meio do microscópio eletrônico de varredura, Mölven et al. (1991) examinaram os 2 mm mais apicais dos canais radiculares, com o objetivo de visualizar a flora apical de dentes infectados e com lesões periapicais. Foram observadas bactérias nessa área em 10 (83,3%) dos 12 casos. Os outros dois casos exibiram bactérias mais coronalmente, com remanescentes teciduais entre as bactérias e o forame apical. Houve predominância de bactérias em forma de bastonetes, contudo, filamentos, espiroquetas e cocos também foram vistos. Cocos e bastonetes, às vezes,

formavam microcolônias. Ocasionalmente, cocos foram vistos aderidos aos filamentos formando estruturas semelhantes a espiga de milho. Depósitos lembrando placa bacteriana também foram encontrados dentro do canal radicular. O trabalho demonstrou que o microscópio eletrônico de varredura é útil para estudar a topografia microbiana do canal radicular apical.

Reader et al. (1994) descreveram o tratamento de uma lesão endodôntica refratária, de onde o único microrganismo cultivado da área periapical foi o *Staphylococcus aureus* (100%). Estes microrganismos são imóveis, anaeróbios facultativos Gram-positivos e são considerados a mais severa de todas as bactérias não esporuladas, sendo capazes de permanecer viáveis por longos períodos devido à resistência às alterações de umidade e temperatura. A maioria dos *S. aureus* é capaz de desenvolver resistência aos antimicrobianos rapidamente, incluindo a penicilina, pela produção da penicilinase (β -lactamase), a qual cliva o anel β -lactâmico causando a hidrólise e destrói a atividade do antibiótico. Foi prescrito para o caso "Augmentin" (250mg) por ser um antibiótico penicilinase resistente. Este antibiótico contém 250mg de amoxicilina, que é um antibiótico semi-sintético com ação bactericida contra Gram-positivo e Gram-negativo, porém não é resistente à ação da β -lactamase, e 150mg de ácido clavulânico, que apresenta amplo espectro e é efetivo contra o *S. aureus* produtores de β -lactamase e não β -lactamase.

A constatação da existência da placa bacteriana apical e sua relação com a manutenção das lesões periapicais após tratamento endodôntico levou à necessidade de se buscar fármacos que fossem

efetivos no combate a tais microrganismos. Esse medicamento seria utilizado para um tratamento conservador, na tentativa de se evitar as cirurgias parendodônticas, tornando o procedimento endodôntico o menos traumático possível ao paciente. O tratamento endodôntico convencional apresenta a limitação de não permitir o acesso aos microrganismos localizados fora do canal radicular. Portanto, os recursos disponíveis atualmente recaem sobre a busca de uma medicação que seja efetiva no combate aos microrganismos extra-radiculares.

Dentre os materiais utilizados como medicação intracanal, podemos destacar as pastas reabsorvíveis, ou seja, aquelas pastas que não tomam presa após serem introduzidas no canal radicular e que são rapidamente removidas se extravasadas para a região periapical. As pastas reabsorvíveis podem ser de dois tipos: pastas à base de iodofórmio e pastas à base de hidróxido de cálcio.

2.1 - Iodofórmio

No que se refere ao iodofórmio, seu emprego em Endodontia tem originado uma série de controvérsias com relação à sua capacidade anti-séptica e de estimulação biológica e muitas dúvidas são levantadas quanto a sua utilização como medicação intracanal.

O iodofórmio foi descoberto por Serullas (1829) e introduzido na terapêutica por Bouchardat (1836) apud Velázquez (1955), tendo sido

considerado anestésico (analogia química com o clorofórmio), anti-sifilítico (analogia com os iodetos) e anti-séptico (pelo componente iodo).

Devido ao seu odor penetrante, efeito tóxico e fraca ação anti-séptica, De Terra (1896) recomendou a substituição do iodofórmio pelo "Salubrol", de composição química correspondente a do tetrabrometo, enfatizando que o iodofórmio apenas paralisa o crescimento da bactéria, não sendo bactericida. No que diz respeito à possibilidade de desenvolver reações adversas, afirma que as propriedades mais perigosas do iodofórmio dependem do fato desta substância apresentar em sua composição acima de 96% de iodo, o qual freqüentemente não é eliminado do organismo por um período considerável, induzindo um efeito cumulativo temeroso, porém que não há perigo de envenenamento pelo iodofórmio visto que a quantidade usada é muito pequena.

Quando utilizado como componente de material obturador do canal radicular, Sarrazin (1924) observou que o iodofórmio associado à guta-percha, resina e clorofórmio prevenia a infecção, provavelmente pelo constante e lento desprendimento do iodo à temperatura ambiente. Recomendou, então, o uso do iodofórmio na obturação do canal, nos casos onde o canal foi devidamente limpo e o forame estivesse acessível, a fim de proteger o periápice contra a infecção e reduzir a inflamação por sua ação anestésica.

Sturridge (1924) relatou que, já em 1884, era prática comum aos dentistas, a introdução de creosoto de faia ou ácido carbólico associados ao iodofórmio, nos canais radiculares de dentes despulpados.

Além disso, o iodofórmio apresentava as propriedades de ser obtido a partir do iodo e ser facilmente dissolvido em ácidos graxos, tais como aqueles encontrados em tecidos sépticos, liberando iodo. O autor também relatou que os produtos da atividade bacteriana são oxidados pelo iodofórmio, o qual inibe o crescimento das bactérias. Portanto, atribuiu os resultados satisfatórios do tratamento endodôntico ao iodofórmio.

Em contrapartida, Camargo (1926) requisitou que o iodofórmio fosse banido da Odontologia pelas seguintes razões: odor forte e desagradável; efeitos totalmente nulos; por causar alteração da cor dos dentes; e pelo fraco poder anti-séptico, não tendo efeito bactericida sobre os microrganismos de secreções purulentas (*Staphylococcus* e *Streptococcus*). Além disso, o iodofórmio se decompõe em iodo, ácido iodídrico e carbono, podendo levar à rápida intoxicação, com os seguintes sintomas: inapetência, cefaléia e insônia, ou à grave intoxicação, com perturbações digestivas e nervosas (insônias, alucinações, delírios). Em ambos os casos, notou-se aumento da pulsação de 130 a 140, sem variação de temperatura.

Walkhoff (1928) apud Pucci (1945) utilizou a pasta "Kri" reabsorvível, que tinha na sua composição o iodofórmio. Essa pasta obteve grande popularidade na Endodontia e, quando extravasada no periápice, era rapidamente reabsorvida, induzindo forte resposta do tecido de granulação acelerando o reparo.

Segundo Thoms (1930), o triiodometano (CHI_3), iodofórmio ou triiodeto de formol, se forma pela ação do iodo sobre o álcool etílico aquoso na presença de álcalis cáusticos ou carbonatos alcalinos. O iodofórmio é

obtido da seguinte forma: dissolve-se duas partes de carbonato sódico cristalizado em oito partes de água. Adiciona-se uma parte de álcool etílico a 90°C, aquece-se em banho-maria a 70°C e, paulatinamente, vai se acrescentando uma parte de iodo pulverizado. Ao esfriar o líquido, o iodoformio se separa em cristais, os quais são filtrados com pouca água fria, secando à temperatura ambiente em papel absorvente. Comercialmente, o iodoformio é obtido por eletrólise de uma solução hidroalcoólica de iodeto de potássio e carbonato potássico. O iodoformio forma pequenos cristais, amarelos e brilhantes, que se fundem a 119-120°C, evapora à temperatura ambiente e se volatiliza com o vapor d'água. Quando empregado como anti-séptico tópico, a dose máxima única deve ser de 0,2g e a dose máxima diária de 0,6g.

Agostini (1934) relatou que o iodoformio havia sido descartado da terapia do canal radicular como obsoleto, porém ele observou que certos dentes desvitalizados, cujos canais tinham sido previamente preenchidos com iodoformio (fato notado pelo odor característico) estavam livres de sintomas patológicos e com área periapical normal ao exame radiográfico. Ao contrário, dentes não vitais que não foram tratados com iodoformio e com obturações deficientes, apresentavam-se, na maioria dos casos, com sinais clínicos de infecção e muitos com lesão periapical assintomática. Acreditando que o iodoformio apresentava uma acentuada ação inibitória sobre o crescimento bacteriano ou sobre suas toxinas, tornou-se adepto ao iodoformio, indicando-o em casos de canais curvos, atrésicos e inacessíveis. No entanto, o autor relatou não saber

determinar se o valor terapêutico desta droga seria devido ao seu grande poder absorvente na presença de umidade ou a sua propriedade de liberar iodo livre.

Prinz & Rickert (1941) afirmaram que as propriedades ligeiramente irritantes do iodofórmio estimulam a proliferação celular e reduzem a capacidade de migração de leucócitos. Quando grandes quantidades dessa substância são rapidamente absorvidas, produzem intoxicação, porém, quando bem administrada (dose média: 4,0g) as intoxicações raramente estão presentes. Os autores também afirmaram que o iodofórmio, por si só, não possui propriedades anti-sépticas, apesar de seu elevado teor de iodo (96%). É facilmente decomposto, quando dissolvido em álcool, éter ou gorduras liberando iodo nascente. As secreções de feridas purulentas que contêm grandes quantidades de substâncias adiposas dissolvem o iodofórmio, especialmente na ausência de oxigênio. O iodo, em estado nascente, age como um potente anti-séptico. Certas bactérias (bacilo do tétano, bacilo da tuberculose, etc.) são rapidamente destruídas pelo iodofórmio. Os produtos da atividade bacteriana são oxidados pelo iodofórmio, tendo portanto atividade desodorizante. Sua utilização em Odontologia é bastante discutida. Alguns acreditam ser um excelente anti-séptico no tratamento de gangrenas pulpares, porém outros o condenam absolutamente. Com a finalidade de diminuir o odor desagradável alguns componentes, como o timol e o mentol, têm sido adicionados. Apesar de remover o odor, a sua composição sofre alteração destruindo amplamente a sua ação terapêutica.

Biolcati et al. (1942) apud Iglesias et al. (1965) relataram dois casos de tratamento endodôntico de dentes infectados, sobreobturados com pasta reabsorvível (iodofórmio, glicerina e paramonoclorofenol canforado) e cones de guta-percha. O estudo histopatológico do primeiro caso demonstrou redução do granuloma periapical primitivo por aposição sucessiva de osso neoformado em sua parede, porém destacaram que o granuloma não reparou totalmente, ficando uma massa de dois milímetros de diâmetro não ossificada. Todavia, essa massa apresentava-se ainda muito infiltrada com plasmócitos, porém sem exsudato purulento. O outro caso mostrou a fagocitose da guta-percha dos cones de obturação por macrófagos.

De acordo com Pucci (1945) o iodofórmio se apresenta sob a forma de cristais hexagonais brilhantes, de cor amarelo-limão, odor penetrante persistente e de sabor desagradável. O iodofórmio é pouco solúvel em água (1:10.000), solúvel em álcool (1:60), porém é mais solúvel em óleo de oliva (1:34), muito solúvel em éter (1:7,5) e especialmente solúvel em ácidos graxos. Frente a substância orgânica em desintegração é pouco estável e de fácil decomposição. O autor relatou que o alto conteúdo de iodo (96%) no iodofórmio, sua instabilidade química e sua fácil dissolução nas substâncias graxas, explicam o fato de que, apesar de não possuir propriedades anti-sépticas, quando o iodofórmio entra em contato com as secreções ou junto com áreas infectadas, ocorre a liberação de iodo. Este age como detergente, desinfetante e desodorizante, devido ao poder redutor do iodo sobre as secreções bacterianas e a capacidade de oxidação do

iodofórmio. O autor afirmou que o iodofórmio estimula as granulações pela influência específica do iodo sobre o desenvolvimento celular e possui efeito ligeiramente anestésico. O contato da pasta iodoformada com as lesões periapicais estimula a regeneração tissular, ao ser facilmente decomposta e reabsorvida. Por ser radiopaco é possível comprovar, radiograficamente, o grau de penetração do iodofórmio nos tecidos periapicais patológicos, controlando sua reabsorção periódica e benéfica.

Giovacchini (1947) apud Aydos & Milano (1984) comprovou que o iodofórmio não é irritante e é bem tolerado pelos tecidos, ou seja, é biocompatível, não danificando a célula viva. Manifesta ainda que a escola suíça considera que o iodofórmio favorece a formação de tecido de granulação. O autor relatou que o valor anti-séptico do iodofórmio foi muito discutido e seu mecanismo de ação ainda não foi bem elucidado. Foi demonstrado, entretanto, que o iodofórmio não é germicida, porém sua presença parece diminuir ou anular os efeitos das substâncias tóxicas resultantes da decomposição da albumina. Menciona ainda que o seu efeito anti-séptico *in vitro* é nulo, enquanto que *in vivo*, em feridas fechadas, privadas do oxigênio do ar, o iodofórmio limita a ação das bactérias.

Engel (1950) apud Iglesias et al. (1965) efetuou um estudo seguindo o método de Walkhoff em 18 dentes com granuloma, com um período de observação de 6,5 anos. Em 17 casos houve identidade entre os resultados radiográficos e histológicos. Em 15 casos pôde-se comprovar a cicatrização apical por aposição de cimento no ápice e no conduto radicular até o fechamento do forame. Uma aposição óssea levou à redução do

periodonto até sua espessura normal, exceto em alguns casos, onde a redução foi menor.

O estudo clínico utilizando iodofórmio mais citado na literatura foi realizado por Castagnola (1950) apud Nichols (1984), que apresentou 73-80% de sucesso utilizando a pasta de Walkhoff. Embora estes resultados não tenham sido tão impressionantes quanto aqueles de estudos iniciais nos quais pastas não reabsorvíveis foram usadas, o autor chamou atenção ao fato que esses tratamentos foram realizados por estudantes. Segundo o autor, o iodofórmio é uma substância facilmente reabsorvível e a remoção da pasta de Walkhoff ocorre apenas pela ação das células teciduais, fato importante no caso de ser extravasado além do ápice.

Castagnola & Orlay (1952) relataram que o tratamento com a pasta de Walkhoff é um método usado na Escola Dental de Zürich, com alto índice de sucesso. Essa pasta consiste de iodofórmio esterilizado associado a uma mistura de paraclorofenol-cânfora-mentol. Segundo os autores, o iodofórmio é um ótimo veículo para tais drogas, por ser radiopaco, não irritante, não contrátil, não solúvel, rapidamente reabsorvível, aderindo bem às paredes do canal. Quanto ao poder desinfetante do iodofórmio, parece que não há liberação de iodo quando em contato com os tecidos vivos. A única contra-indicação seria a alergia ao iodo, uma condição que afeta uma pequena porcentagem da população. Para examinar o poder bactericida e a estabilidade das pastas obturadoras de canal radicular foram feitos testes sobre diferentes culturas bacterianas. O poder bactericida foi medido pelo diâmetro do halo de inibição de crescimento ao redor das pastas. Os testes

mostraram que o melhor resultado foi obtido com a pasta de Walkhoff (Kri 1), produzida pela Pharmachemie Zürich; a seguir, a melhor foi a pasta original de Walkhoff, com uma perda de apenas 20% do poder bactericida num período de 10 anos. Todas as pastas atuaram mais fortemente sobre os estafilococos e leveduras. Foram analisados 1000 casos de gangrena pulpar tratados com curativos de clorofenol e obturados com pasta de iodofórmio e, em 68% dos casos obteve-se resultados perfeitos. Em 78% dos casos pôde-se encontrar melhoras e, nas mãos de um profissional hábil e experiente, a porcentagem de sucesso seria muito maior. Em 35 casos de gangrena pulpar e destruição periapical obteve-se resultados perfeitos praticamente em todos. Um achado importante é que a reabsorção da pasta da região apical do canal radicular é um sinal de sucesso e não um sinal de obturação radicular incompleta.

Velázquez (1955) reporta que o iodofórmio libera iodo pela ação dos seguintes agentes: calor; agentes oxidantes; radiações actínicas; oxidases e catalases dos tecidos, onde reside, provavelmente, uma parte da ação anti-séptica do iodofórmio nos tecidos. Há indivíduos com sensibilidade a essa substância, apresentando sintomas tóxicos frente a doses menores: cutâneos (eritemas; vesículas), nervosos e mentais (intranquilidade psíquica, melancolia, alucinações, delírio, depressão, podendo terminar em coma e morte). O autor aconselhou, nesses casos, que se remova o excesso de iodofórmio aplicado, administre-se alcalinos (bicarbonato) e se provoque a diurese (líquidos, leite) como medidas favoráveis para a desintoxicação.

Segundo Goransson (1957) apud Nichols (1984), a introdução de iodofórmio no canal radicular pode levar a um aumento no nível de iodo sanguíneo, por isso, pastas de iodofórmio não deveriam ser usadas em pacientes sensíveis ao iodo.

Sollmann (1957) afirmou que o iodofórmio foi praticamente abandonado devido suas desvantagens, especialmente o odor persistente. O iodofórmio está sujeito a desenvolver irritação em indivíduos susceptíveis, produzindo eczemas, mesmo quando empregado em pequenas quantidades. Pode causar severo envenenamento quando aplicado sobre uma grande área ou quando injetado. Os sintomas são diurese, náusea, anorexia, fadiga e sonolência, dor de cabeça, confusão, apatia ou irritabilidade, alucinações, diminuição dos reflexos, leves confusões e paralisia. O antídoto é o bicarbonato de sódio. Por si só o iodofórmio é praticamente insolúvel e provavelmente inativo, porém, em contato com os tecidos ou seus extratos e, particularmente, com tecidos doentes e com bactérias, libera iodo tão lentamente que os efeitos são leves, mas de algum modo anti-séptico para as bactérias e estimulante para as células. Seca as secreções das feridas e é moderadamente hemostático e analgésico.

Hayashi (1958) usou para o tratamento de canal de dentes de cães, pastas contendo iodofórmio e obteve os seguintes resultados: formação de pólipos cicatriciais intracanal; encapsulamento do material obturador extravasado pela proliferação de tecido conjuntivo fibroso e tecido osteóide; fechamento natural das ramificações e forame apical por tecido cementóide ou osteóide; reparo da inflamação apical inicial por tecido

conjuntivo fibroso; e reparo por regeneração ativa do osso alveolar. Além disso, o processo de reparo da região periapical do dente decíduo após o tratamento do canal radicular infectado foi, morfologicamente, o mesmo daquele que ocorre com os dentes permanentes.

De acordo com Juge (1959), as pastas reabsorvíveis não deveriam interferir no processo de cura natural, ou seja, o fechamento do forame apical pela aposição de cimento e dentina. Essas pastas eram indicadas em todos os casos onde havia o risco do material obturador ultrapassar o ápice. O autor concordou apenas com as pastas iodoformadas de Walkhoff e de hidróxido de cálcio (tipo "Calxyl"). Após breve revisão das propriedades dos principais produtos, alguma consideração foi feita sobre os controles clínico, radiográfico e histológico realizados. As pastas iodoformadas eram indicadas para obturação de canais previamente infectados, com ou sem lesão periapical. O autor afirmou que, segundo Walkhoff, o iodofórmio não é irritante, é reabsorvível, paralisa secreções, tem ação anti-séptica de longa duração até ser reabsorvido e é bem tolerado pelos tecidos periapicais, produzindo fechamento fisiológico do ápice. Quando há falhas no preenchimento do ápice com a pasta, por contração ou reabsorção, ocorrem resultados desfavoráveis, devido à criação de um espaço morto, o qual não possui mecanismo de defesa contra a infecção. O hidróxido de cálcio, por sua vez, seria mais útil para obturação após pulpectomia ou pulpotomia, após ou sem desvitalização. O autor recomendou que as pastas fossem colocadas por meio de uma espiral de lentulo.

Litter (1964) afirmou que somente o iodo elementar é ativo do ponto de vista anti-séptico e os sais (iodetos) são inativos. O iodo elementar é um dos germicidas mais potentes; sua ação é muito rápida, mas se combina e é inativado facilmente pela matéria orgânica. Em contato com soro, sangue ou tecidos, precipita proteínas e se transforma parcialmente em iodetos inativos. O autor relata que segundo Reddish (1957) o iodo destrói bactérias sem ação seletiva, incluindo esporos, amebas e vírus. O mecanismo de ação germicida não está bem esclarecido; provavelmente o iodo se combina com as proteínas bacterianas, precipitando-as; também poderia atuar de forma semelhante ao cloro, por oxidação e iodização dos elementos do protoplasma, mas não está demonstrado. A solubilidade é uma condição necessária para ação anti-séptica. Muitos compostos foram introduzidos com a finalidade de liberar iodo elementar, no entanto, somente o iodofórmio realiza tal liberação. Referente ao iodofórmio, afirma que este praticamente não possui efeitos anti-sépticos, acorde Garrod (1940), no entanto, ao entrar em contato com os tecidos libera iodo elementar, porém em quantidade tão pequena e tão lentamente que na prática carece de ação anti-séptica. Além disso, o iodo também é um potente fungicida, matando diversas espécies de *Monilia*, *Torula*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*. O iodo possui efeitos irritantes sobre a pele e mucosas, provocando na pele, eritema e vesículas e, nas mucosas, inclusive efeitos corrosivos. Quando em baixas concentrações, o iodo, não tem grande toxicidade sobre os tecidos. O iodofórmio é absorvido quando aplicado a feridas extensas e excretado pela urina, na forma de iodeto. Relativo à intoxicação, o iodofórmio produz

depressão do sistema nervoso central, consistindo de sonolência, cefaléia, náuseas, hiporeflexia, podendo levar ao coma e morte. O tratamento deve ser sintomático, sendo utilizado analépticos.

Nos casos de lesões periapicais extensas, Capurro (1964) apud Maisto (1975) observou que uma pequena sobreobturação, de 0,5 a 1,0 mm² de superfície, favorece a zona periapical à macrofagia e à atividade fibroblástica tendendo a lograr a reparação.

Held (1964) afirmou que o iodofórmio não exerce ação direta sobre os germes, mas um efeito sobre os tecidos ou sobre o líquido celular, *atenuando as condições de crescimento dos germes*. Além disso, as defesas locais são aumentadas, devido o iodofórmio inibir a formação de gases, pelos microrganismos, facilitando as reações de defesa naturais. O autor relatou ainda, que os resultados favoráveis obtidos com a pasta de Walkhoff seriam, essencialmente, a estimulação da formação de tecido de granulação e a neoformação de tecido ósseo. No entanto, o iodofórmio poderia produzir intoxicação variável levando a sintomatologias como: inapetência, cefaléia, insônia, alucinação, delírio, depressão, anorexia, vômitos, taquicardia e mesmo a morte.

Posteriormente, Maisto (1965) apresentou uma pasta à base de iodofórmio com a seguinte composição: óxido de zinco puro (14g); iodofórmio (42g); timol (2g); clorofenol canforado (3cc); lanolina (0,50g), recomendando, em casos de lesões periapicais extensas, a sobreobturação desta pasta. Nesse caso, segundo o autor, deveria ser utilizada uma espiral de Lentulo em baixa rotação (500 rotações por minuto) sem atravessar o

forame apical, evitando-se o extravasamento abundante, que demoraria a reabsorver e retardaria a cicatrização final. Essa pasta se reabsorve lentamente na zona periapical e dentro do conduto, se desdobrando em iodo em estado nascente ao contato com o tecido periapical e, além disso, estimula a zona periapical a formar um novo tecido de granulação o qual contribui posteriormente com a reparação óssea, permitindo o fechamento do forame apical com cimento. É uma pasta fortemente anti-séptica (ação do clorofenol canforado), podendo produzir irritação e dor na zona periapical durante alguns dias. A ação anti-séptica persiste dentro do conduto por um tempo prolongado (ação do timol).

A fim de estudar a reparação apical após tratamento de dentes com gangrena pulpar e complicação periapical, Iglesias et al. (1965) apresentaram cinco casos tratados com a mesma técnica, na qual a área apical foi cirurgicamente excisada e estudada microscopicamente. Todos os dentes foram tratados em uma sessão da seguinte forma: após o preparo do canal os mesmos foram obturados com duas pastas anti-sépticas: uma rapidamente reabsorvível, constituída de iodofórmio puro, glicerina e paramonoclorofenol canforado, a qual era extruída para o periápice, e outra, lentamente reabsorvível, formada por óxido de zinco (30g), iodofórmio (10g) e timol (1g), utilizando o mesmo veículo que o da pasta anterior, e que era usada para preencher o canal. Esse procedimento visava evitar a reabsorção da pasta dentro do canal radicular. A obturação foi complementada com cones de guta-percha pela técnica da condensação lateral. O controle radiográfico à distância revelou apreciável diminuição ou

desaparecimento da zona radiolúcida periapical. Observou-se também, reabsorção da pasta de obturação extravasada. Histologicamente, verificou-se neoformação óssea e desaparecimento da pasta obturadora, inclusive dentro do conduto radicular, até atingir, em alguns casos, o cone de gutapercha. A pasta anti-séptica foi substituída por tecido conjuntivo invaginado, com persistência, às vezes, de focos infiltrativos crônicos. Os achados clínicos e radiográficos foram comparados com os dados histopatológicos obtidos e verificou-se que embora o reparo clínico e histológico, aparentemente, tenha ocorrido, persistiram fatores na vizinhança do ápice retardando o processo reparativo.

Com a finalidade de observar o comportamento dos tecidos periapicais às pastas reabsorvíveis, Maisto & Erausquin (1965) realizaram um estudo utilizando 90 ratos, os quais receberam tratamento endodôntico na raiz do primeiro molar inferior esquerdo e posterior obturação com três tipos de pastas reabsorvíveis à base de iodofórmio: (1) Pasta lentamente reabsorvível (óxido de zinco, 14g; iodofórmio, 42g; timol, 2g; clorofenol canforado, 3ml; lanolina, 0,5g); (2) Pasta rapidamente reabsorvível (iodofórmio; partes iguais de clorofenol canforado e glicerina); e, (3) Pasta rapidamente reabsorvível de iodofórmio e hidróxido de cálcio (partes iguais de iodofórmio e hidróxido de cálcio; em solução aquosa de metilcelulose a 3%). Após períodos de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 dias, os animais foram sacrificados. A observação histológica permitiu concluir que as pastas testadas determinavam a presença, nos tecidos periapicais, de um infiltrado predominantemente de polimorfonucleares, que tendeu a regredir e

tornar-se linfocitário após várias semanas; o material sobreobturado foi reabsorvido rapidamente, enquanto, o tecido periodontal se invaginou mais lentamente no conduto, bastante vascularizado e com numerosos macrófagos, reabsorvendo parcialmente a pasta. Essa reabsorção é feita principalmente por macrófagos, mas também parece haver uma participação dos polimorfonucleares; o fechamento do conduto só foi observado em animais muito jovens. Os ratos tratados aos 60 dias apresentaram, algumas vezes, depósitos de cimento que reduziam a luz do conduto, sem obter o fechamento completo; não foi possível observar diferenças na reação dos tecidos periapicais frente a cada uma das 3 pastas utilizadas; é provável que a necrose do cimento e as reabsorções radiculares, muito freqüentes, sejam devido à injúria pela técnica operatória e não pelas características das pastas testadas; e que, o tipo de reação tecidual do rato parece ser muito semelhante ao observado no homem e no cão. As diferenças essenciais são determinadas pelo tamanho das distintas estruturas, muito mais reduzido no maxilar do rato, assim como pela curta vida deste animal, que não permite o estudo de processos de longa duração.

Muruzábal et al. (1966) estudaram, histologicamente, 109 canais radiculares da raiz mesial do primeiro molar inferior de ratos, os quais foram sobreobturados com diversos materiais, dentre os quais a pasta iodoformada de Walkhoff. Observaram que, quando o material sobreobturado era duro e compacto, os tecidos circundantes tendiam a encapsulá-lo. Contudo, uma zona de tecido conjuntivo frouxo, contendo muitos macrófagos, freqüentemente se formava entre a cápsula e o material

obturador. Por outro lado, quando o material não era tão compacto, como a pasta de iodofórmio, sofreu desintegração provocando uma reação tecidual mais intensa e foi mais rapidamente reabsorvido. Quando o excesso de material preenchia totalmente o espaço periapical havia necrose do osso. Houve reabsorção do osso necrótico e do material sobreobturado, tanto do ligamento periodontal como da medula óssea vermelha adjacente. O material em contato com a medula óssea tornou-se encapsulado mais lentamente do que aquele em contato com o ligamento periodontal e a reabsorção foi mais lenta. Um achado freqüente foi a reabsorção total da porção apical da raiz, deixando o material obturador do canal radicular em contato direto com o ligamento periodontal apical, levando à reabsorção secundária do material obturador. Quando a reabsorção radicular deixou o material sobreobturado em contato direto com a membrana periodontal, a reação tecidual variou de acordo com a natureza do material. Enquanto o óxido de zinco e eugenol induziu uma leve reação inflamatória e foi reabsorvido mais lentamente, as pastas reabsorvíveis provocaram um maior infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e foram rapidamente reabsorvidas.

Erausquin et al. (1966) estudaram, microscopicamente, 48 sobreobturações de canal radicular com diferentes materiais na raiz mesial do primeiro molar inferior de rato, apresentando áreas necróticas do ligamento periodontal, a fim de determinar a causa desses distúrbios. Diversos materiais foram estudados dentre os quais, óxido de zinco e eugenol e pasta iodoformada de Walkhoff. Quando o material sobreobturado

ocupou o espaço periodontal apical, observou-se quase constantemente, necrose da área adjacente ao ligamento periodontal lateral. A injeção vascular de tinta da Índia mostrou que os vasos do ligamento periodontal originam-se no retículo do fundo alveolar. A necrose do ligamento periodontal provocou a necrose do cemento adjacente e do osso alveolar. A regeneração do ligamento periodontal foi rápida e completou após 7 dias; ao contrário, a reabsorção e regeneração do osso e cemento requereu um maior período de tempo. Segundo os autores, a necrose do ligamento periodontal, em casos de sobreobturação, pode ter sido correlacionada a um infarto devido à obstrução dos vasos na área apical.

Utilizando implantes de tubos de polietileno, contendo diversos materiais obturadores, no tecido subcutâneo de coelhos, Friend & Browne (1968) observaram que a pasta "Kri 1" produziu intensa reação inflamatória dentro de 2 a 4 dias, com uma acentuada necrose tecidual, circundada por leucócitos polimorfonucleares. Células inflamatórias iniciaram a migração para o lúmen do tubo e o tecido necrótico nas extremidades do tubo foi lentamente removido, de modo que após 4 semanas reparou completamente. Nesse estágio, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos preencheram todo o comprimento do tubo. Em 2 espécimes implantados por 3 meses ou mais, tecido fibroso contendo grupos de macrófagos preenchidos com grânulos do material, ocupou todo o lúmen. Nos espécimes remanescentes, o material foi reabsorvido e um coágulo eosinofílico preencheu o lúmen. As extremidades dos tubos foram cobertas com um tecido fibroso livre de células inflamatórias. Concluíram que, apesar

da acentuada irritação produzida inicialmente pela pasta "Kri 1", a mesma parece ser bem tolerada pelos tecidos periapicais.

Por sua vez, Bell (1969) estudou o efeito da pasta "Kri 1" e seus constituintes sobre o crescimento do tecido conjuntivo, e a taxa de formação óssea em uma cavidade óssea. Para o estudo foram utilizados fêmurs de ratos Wistar doadores, onde foram criadas cavidades ósseas padronizadas. Para manter as concentrações relativas do veículo e do iodofórmio utilizou-se, como veículo, o polietileno glicol, que é uma substância inerte. Os tubos foram implantados e após 4, 14 e 28 dias os animais foram sacrificados e os espécimes preparados para avaliação histológica. Os resultados mostraram que a pasta "Kri 1" retardou a formação de tecido conjuntivo e impediu a formação de novo osso ao longo de 28 dias. O veículo da pasta "Kri 1" pareceu retardar a maturação do tecido conjuntivo e diminuir a reabsorção óssea. Comparando-se o polietileno glicol com o polietileno glicol associado ao iodofórmio, parece que o iodofórmio retardou a formação de tecido conjuntivo e osso. De acordo com o autor, a presença do polietileno glicol pareceu acelerar a remoção da pasta "Kri 1" pelo fluido tecidual.

A fim de investigar o comportamento de diferentes pastas de iodofórmio reabsorvíveis e a resposta dos tecidos periapicais, Erausquin & Muruzábal (1969) realizaram um estudo em molares de rato. As pastas foram colocadas na raiz mesial do primeiro molar inferior em 315 ratos Wistar. Os animais foram sacrificados de 1 a 90 dias após o tratamento. Baseados nos achados histológicos, os autores concluíram que a taxa de

reabsorção das diferentes pastas não foi uniforme. A pasta de Maisto, contendo maior quantidade de óxido de zinco e a pasta de Palazzi, reabsorveram mais lentamente. Houve uma grande diferença na velocidade de reabsorção nos espécimes em que a mesma pasta foi empregada. A reação do tecido periapical à sobreobturação com pastas reabsorvíveis foi mais suave que aquela causada pelos cimentos de canal radicular. Contudo, o tecido recém-formado dentro do canal freqüentemente mostrou uma reação inflamatória resultando, ocasionalmente, em granulomas periapicais e/ou abscessos. Os melhores resultados foram obtidos quando a absorção da pasta foi prevenida ou pela obstrução do forame por remanescentes dentina-polpa ou por precipitação de cálcio na pasta. No entanto, encontraram que o desaparecimento da pasta do canal não era sinônimo de um resultado satisfatório, visto que o tecido que invadiu o canal, às vezes, estava inflamado.

Realizando estudo em dentes de cães, Barker & Lockett (1971) demonstraram que a pasta de iodofórmio "Kri", que se extravasava nos ápices, era mais rapidamente eliminada da região periapical e do canal apical, sendo o tecido de granulação substituído por tecido conjuntivo saudável, ao passo que ao extravasar o óxido de zinco e eugenol, este não era reabsorvido, causando uma reação do tipo corpo estranho. A pasta desapareceu não apenas da região periapical, mas também do próprio canal radicular, ocorrendo posterior invaginação de tecido para dentro do mesmo. Ocasionalmente, este processo pode ocorrer por toda a extensão do canal radicular. Para retardar sua rápida reabsorção adicionaram diferentes

quantidades de óxido de zinco, o qual é inerte. Também notaram que a invaginação de tecido era limitada em extensão e nem sempre alcançava o nível da pasta residual. Assim poderia resultar num espaço destituído de material obturador e tecido vital. Para retardar sua rápida reabsorção os autores aconselharam que se utilizasse, nos 2/3 coronários do canal, gutapercha ou um cimento mais duro, a fim de conter a pasta. Concluíram que a reabsorção da pasta "Kri" era devida à combinação de fagocitose e drenagem direta para os nódulos linfáticos associados.

Maisto (1975) relatou que as pastas anti-sépticas à base de *iodofórmio e clorofenol canforado-mentol ou glicerina* são rapidamente reabsorvíveis na zona periapical. O iodoformio é acentuadamente radiopaco, se volatiliza lentamente em contato com o ar e à temperatura ambiente e, mais rapidamente, a uma temperatura constante de 37°C. Por sua vez, a pasta anti-séptica à base de iodoformio, com uma parte de óxido de zinco e eugenol para cada três partes de iodoformio, é lentamente reabsorvível na zona periapical e praticamente não se reabsorve dentro do conduto. Além disso, se agregado a outros anti-sépticos é perfeitamente tolerado no periápice, ainda que em grandes sobreobturações. Seu valor como anti-séptico é muito relativo, mas são bem conhecidas as reparações de extensas lesões periapicais posteriormente a sua aplicação. O iodoformio libera iodo em estado nascente ao entrar em contato com o tecido periapical, estimula a formação de novo tecido de granulação que contribui, posteriormente, para a reparação óssea. Atua em melhores condições privado de oxigênio, em meio alcalino. A sua ação, estimulante e benéfica

ou tóxica e necrotizante, depende da quantidade e concentração das drogas, assim como, especialmente, da sua velocidade de reabsorção.

Vojinović & Srnić (1975) realizaram estudo a fim de comparar a resposta histológica dos tecidos apicais e a complementação da formação apical a dois materiais obturadores: pasta de iodofórmio-Chlumsky (solução de fenol, cânfora e álcool absoluto) e pasta de hidróxido de cálcio. Foram usados dentes permanentes de 6 cães jovens, com rizogênese incompleta. Após anestesia geral, foi realizada a extirpação pulpar em dois pré-molares adjacentes em cada cão. Um dos dentes foi preenchido com pasta de iodofórmio-Chlumsky e o outro com pasta de hidróxido de cálcio. Os dentes foram selados com amálgama. Estudos histológicos realizados aos dois e sete meses e meio levaram às seguintes conclusões: maior quantidade de material calcificado foi encontrado naqueles canais obturados com pasta de hidróxido de cálcio puro do que naqueles obturados com pasta de iodofórmio. Portanto, o fechamento apical de dentes com rizogênese incompleta pareceu ser mais rápido na presença de hidróxido de cálcio; o tipo de pasta usado teve pouca influência na estrutura do tecido calcificado que ocluiu o amplo forame de dentes com rizogênese incompleta. Entretanto, o modo de fechamento era muito mais completo na presença de hidróxido de cálcio; a pasta de iodofórmio foi irritante, provocando acentuada reação inflamatória nos tecidos adjacentes, necessitando um período maior para a reparação; e, o hidróxido de cálcio não produziu reação inflamatória e sim uma pronunciada barreira calcificada.

Segundo Castagnola & Wirz (1976) a pasta de iodofórmio *in vitro* não possui propriedades bactericidas e *in vivo* existem divergências quanto a sua ação bactericida. Além disso, apresenta as seguintes propriedades negativas: (a) É reabsorvido dentro do canal e, muitas vezes, invagina tecido de granulação para o canal; (b) Como não toma presa, não propicia um ótimo selamento hermético do canal, resultando na possibilidade de reinfecção; (c) Sabor desagradável; (d) Pode, raras vezes, desencadear idiossincrasia. Por outro lado, a pasta de iodofórmio tem como propriedades positivas: (a) Estimula a formação de tecido de granulação; (b) Diminui a secreção apical; (c) É muito radiopaco; (d) É de fácil manipulação; (e) Facilmente reabsorvido - importante se é extravasado além do ápice. As indicações para o uso da pasta de iodofórmio estavam limitadas às seguintes situações: (a) extirpação da polpa, não devendo ser usada como material obturador de canal definitivo; preferindo-se pastas de óxido de zinco associado ao iodofórmio; (b) tratamento da polpa gangrenosa, onde após preparo químico-mecânico do canal, o mesmo é preenchido com a pasta de iodofórmio com leve extrusão e, na presença de granuloma apical, a lesão deve ser preenchida com a pasta; (c) após a criação de uma fistula artificial, a zona osteítica deve ser preenchida com a pasta; (d) canal gangrenoso em pacientes jovens, promovendo o reparo de lesões periapicais e formação radicular; (e) tratamento preparatório para apicectomia; (f) tratamento preparatório para implante endodôntico.

Bazerque (1976) relatou que o iodofórmio se apresenta como um sólido que forma cristais hexagonais, amarelos, de odor característico,

forte e persistente. É volátil e por ação do calor desprende vapores de iodo. Sua ação deve-se à liberação de iodo, já que o contém em proporção de 96% aproximadamente. Para que se produza este desprendimento o iodofórmio deve estar em contato com os líquidos orgânicos e essa liberação ocorre lentamente. Por isso, sua ação anti-séptica é fraca, porém persistente. Além disso, é um analgésico suave quando se aplica sobre mucosas ou feridas abertas. Estas propriedades fizeram com que o iodofórmio fosse usado em Odontologia, para o tamponamento de feridas ósseas, na forma de gaze iodoformada e, especialmente, para a obturação de condutos. Tem sido utilizado em contato com a polpa ou no interior dos canais radiculares devido à tolerância dos tecidos e sua pouca ação irritante, mesmo em sobreobturações amplas. Há uma grande variedade de pastas à base de iodofórmio e clorofenol. Agregados com o óxido de zinco dão mais radiopacidade, diminuindo a concentração dos elementos mais ativos e tornando as pastas mais lentamente reabsorvíveis. Também pode ser misturada ao hidróxido de cálcio, o qual coadjuva com a ação anti-séptica e tem uma ação cáustica limitada, proporcionando um meio alcalino e de alta concentração de cálcio, que favorece a calcificação.

As vantagens do iodofórmio em Endodontia, segundo Semeraro (1978) referem-se ao fato de que os canais radiculares apresentam condições favoráveis à liberação do iodo contido na pasta: o canal não tem luminosidade; a temperatura do corpo oferece condições para sua decomposição; há exsudatos derivados de matérias necróticas irremovíveis pela instrumentação, com os quais o iodofórmio entra em

contato e libera iodo (Pucci, 1945); esse iodo penetrará nos túbulos dentinários, mesmo quando associado em pasta sendo utilizados veículos de baixa tensão superficial, que facilitam sua penetração nos túbulos; dentro do canal isento de oxigênio do ar, em ambiente alcalino, parece atuar em condições ideais. Assim é um anti-séptico que pode ser usado em casos de pulpectomia e polpa morta; por sua indiferença frente aos tecidos vivos é indicado em lesões periapicais graves (Pucci, 1945).

Na área da Odontopediatria, o iodofórmio tem sido utilizado com sucesso. Assim sendo, Guedes-Pinto et al. (1981) propuseram uma mudança na metodologia do preparo do canal de dentes decíduos com polpa mortificada. No novo método, após o preparo do canal, utilizando-se como substâncias químicas auxiliares, o "Endo-PTC" e solução de Dakin, os canais eram obturados com uma mistura de partes iguais de iodofórmio, paramonoclorofenol e "rifocort"; base de guta-percha na câmara; selamento da cavidade. Os resultados mostraram um alto índice de sucesso (45 casos) com esta técnica, com apenas um caso de insucesso. Os dentes que apresentavam fístula tiveram, após uma semana, regressão espontânea da fístula. Nenhum caso apresentou dor pós-operatória, talvez devido à presença do corticosteróide na fórmula do "rifocort", que possui efeito anti-inflamatório e controla a reação flogística (Paiva & Alvares, 1979). Além disso, o carbowax (veículo do "Endo-PTC") é um produto graxo com atividade detergente, totalmente solúvel em água e com efeito de proteção tecidual, diminuindo a atividade irritante das drogas anti-sépticas (Lane & Blank, 1946). Radiograficamente, observou-se que quando houve

extravasamento da pasta, esta foi reabsorvida em mais ou menos 30 dias após a conclusão do tratamento e era sempre seguida de neoformação óssea. Após um período de 6 meses ocorria a reparação óssea. Dentes que apresentavam mobilidade, após 7 a 15 dias voltavam ao normal. Finalmente, em 2 anos de preservação não houve recidiva em nenhum caso.

Rifkin (1982) enfatizou o uso de uma pasta reabsorvível de iodofórmio em vez do óxido de zinco e eugenol, baseado nos excelentes achados clínicos e radiográficos relatados em estudo prévio (Rifkin, 1980). Em todos os casos os canais foram obturados com pasta "Kri". No presente estudo, a curto prazo (um ano) e a longo prazo (3,5 anos), observaram que, radiograficamente, houve redução da radiolusência na furca, em mais de 86% dos casos, indicando uma paralisação da inflamação. Além disso, o excesso de pasta extruída foi reabsorvida dentro de uma a duas semanas. Parece que um procedimento de pulpectomia usando a pasta "Kri" é um tratamento promissor a curto e longo prazo de dentes decíduos não vitais ou com abscessos.

Segundo Nichols (1984), a expressão material obturador reabsorvível é geralmente usada para indicar uma pasta que não endurece após ser introduzida no canal radicular, sendo rapidamente removida se forçada para a região periapical; a pasta também pode ser removida do interior do canal radicular. No entanto, o desaparecimento desse material da região periapical é um processo lento e, normalmente, não continua para dentro do canal. Além disso, embora alguns pesquisadores afirmem que a

pasta de iodofórmio estimula os tecidos periapicais e acelera a regeneração óssea, nenhuma evidência parece apoiar isto.

Aydos & Milano (1984) estudaram o uso do iodofórmio em Endodontia baseados na revista da literatura. Os três principais tópicos investigados, relacionados à substância foram a radiopacidade, a capacidade anti-séptica e a possibilidade de estimulação biológica, levando ao reparo do tecido apical. Concluíram que o iodofórmio confere radiopacidade à pastas do tipo hidróxido de cálcio, originalmente radiolúcidas; não possui ação antibacteriana *in vitro* e há divergência entre os autores quanto à ação antimicrobiana *in vivo*; e, a capacidade de estimulação biológica do iodofórmio, pela falta de investigações só pode ser considerada como uma hipótese.

Michel (1984) estudou a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos submetidos à ação da pasta obturadora de canais de dentes decíduos com polpa mortificada, proposta por Guedes-Pinto et al. (1981), em diferentes tempos experimentais. Os resultados mostraram, desde os períodos iniciais, resposta inflamatória bastante discreta, com predominância de células mononucleares desde o terceiro dia. Aos 7 dias, já eram observados alguns macrófagos contendo no seu citoplasma material interpretado como sendo o injetado. Aos 14 dias, esse quadro se repete com vários macrófagos em íntimo contato com o material. Já aos 28 dias, o material encontrou-se em menor quantidade que nos períodos anteriores e o número de macrófagos com material no seu interior era grande. A partir daí, a atividade macrofágica diminuiu, com o material

ocupando área bem menor, até que, aos 90 dias, com exceção de um único animal, não apareceram mais vestígios da pasta e o tecido conjuntivo subcutâneo do animal exibiu características de normalidade. O autor acredita que a baixa intensidade da reação inflamatória se deveu à presença do corticosteróide na pasta obturadora. Além disso, a boa tolerância à pasta pareceu dever-se ao propilenoglicol (veículo do "rifocort") que, por possuir baixa toxicidade é muito empregado como veículo em loções, pomadas e cosméticos (Bazerque, 1976). A atividade macrofágica intensa pareceu ser devida ao iodofórmio, pela grande facilidade com que é reabsorvido (Maisto & Erausquin, 1965). O autor concluiu que a pasta testada mostrou-se bem tolerada pelos tecidos, o que ficou caracterizado pela discreta reação inflamatória causada no tecido conjuntivo subcutâneo do camundongo. A pasta foi totalmente reabsorvida, na maioria dos casos, aos 90 dias, voltando o tecido conjuntivo subcutâneo do camundongo a apresentar características de normalidade.

Garcia-Godoy (1987) avaliaram a efetividade de uma pasta de iodofórmio (pasta "Kri 1") no tratamento de canal radicular de dentes decíduos infectados. Os canais, após limpos e preparados, foram preenchidos com a pasta "Kri 1". A cada 6 meses foram feitos exames clínicos e radiográficos do tratamento de canal radicular. Observou-se que a pasta de iodofórmio é um efetivo material obturador para dentes decíduos infectados e que reabsorve das áreas periapicais e da furca pelos macrófagos em uma a duas semanas. Outra vantagem da pasta "Kri" é que permanece no estado pastoso e nunca endurece para formar uma massa

dura, facilitando sua remoção, se necessário. Uma desvantagem observada pelo autor foi a coloração amarelo-castanho na coroa dos dentes, aconselhando limpar a câmara pulpar após inserção da pasta.

Chedid (1988) comparou, histologicamente, a ação da pasta obturadora preconizada por Guedes-Pinto et al. (1981) e do formocresol, ambos usados após pulpotomias em molares de rato de linhagem Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos, onde cada grupo era estudado em um tempo experimental, ou seja, 3, 7, 14 e 28 dias após procedimento operatório. Os ratos tratados com formocresol apresentaram, ao longo do experimento, três áreas histológicas básicas: área de necrose, que pode ou não evoluir com o tempo; área inflamatória, cuja extensão variou de acordo com o tempo do experimento; e, tecido pulpar normal. Por sua vez, os espécimes tratados com a pasta apresentaram-se com sinais histológicos favoráveis e, mesmo que ocorresse reação inflamatória inicial, ao final do experimento o tecido remanescente se apresentou normal e houve completa obliteração da entrada dos condutos através de ponte dentinária.

Holan & Fuks (1993) realizaram um estudo a fim de comparar o sucesso do tratamento endodôntico de molares decíduos não vitais utilizando o cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE) ou a pasta "Kri". Foram realizados preparo com limas, irrigação com solução salina, sendo que, dos 78 molares decíduos necróticos, 34 foram obturados com ZOE e 44 com uma pasta contendo iodofórmio (pasta "Kri"), as quais foram introduzidas no canal radicular com espiral de Lentulo em baixa rotação. Os dentes foram controlados, clínica e radiograficamente, para avaliar o

sucesso do tratamento, durante um período que variou de 12 a 48 meses ou mais. O tratamento foi julgado satisfatório quando preencheu os seguintes critérios clínicos: (1) ausência de mobilidade anormal; (2) ausência de sensibilidade à percussão; (3) tecido mole, sem edema, sem rubor ou fístula; e, radiográficos: (1) patologia pré-operatória inter-radicular e/ou radioluscências resolvidas e nenhuma radioluscência patológica nova desenvolvida pós-operatoriamente; (2) reabsorção radicular externa patológica eliminada. Dos resultados observou-se que o ZOE apresentou 65% de sucesso, enquanto a pasta "Kri" obteve 84% de sucesso, diferença esta estatisticamente significativa ($P < 0,05$), provavelmente devido à pasta "Kri" ter ação bactericida e capacidade de penetrar os tecidos, controlando a infecção nas paredes dentinárias. Quanto à sobreobturação, a pasta ZOE levou ao insucesso em 59% dos casos, ao passo que a pasta "Kri", apenas 21% ($P < 0,02$). Quando ocorreu subobturação, houve uma proporção de insucesso de 17% para o ZOE e 14% para a pasta "Kri". Os autores acreditam que os efeitos da extrusão de ZOE além do ápice radicular deve iniciar uma reação do tipo corpo estranho devido ao efeito irritante do material. Além disso, a reabsorção de ZOE pode ser demorada, porém neste estudo não ocorreu retenção de ZOE. Baseado neste estudo os autores justificaram recomendar a pasta "Kri" como material obturador radicular para molares decíduos não vitais.

Çallışkan & Pişkin (1993) apresentaram o relato de um caso onde a extrusão de pasta de iodofórmio, para o interior do canal mandibular, desenvolveu reabsorção interna de um dente adjacente, embora se saiba

que a etiologia desta patologia não está totalmente identificada. Como consequência à extrusão pode ocorrer, também, dano ao nervo mandibular, parestesia (perda da sensibilidade) na mucosa e pele do lábio inferior, sendo que, quanto mais reabsorvível o material, maior será a probabilidade de sobrevivência do nervo e, neste caso, a reabsorção da pasta de iodofórmio extruída no canal mandibular, ocorreu em 45 dias, persistindo porém, a parestesia e rubor local por um longo tempo. Além disso, a pressão indireta causada pela reação inflamatória poderia desempenhar um papel maior na intensificação dos sintomas clínicos. De acordo com exames clínicos e radiográficos feitos após 7 anos, o dente estava clinicamente assintomático, vital e a reabsorção interna controlada sem tratamento.

Thomas et al. (1994) descreveram uma técnica simples e efetiva para o tratamento endodôntico de 36 dentes decíduos em sessão única, utilizando a pasta de iodofórmio, com a finalidade de preservar o dente decíduo com envolvimento pulpar e eliminar a infecção. Os canais foram preenchidos com pasta de iodofórmio, óxido de zinco e água destilada, sendo que nenhum paciente sentiu dor pós-tratamento. Os resultados mostraram que em 6 casos a fístula desapareceu mostrando as excelentes propriedades reparativas da pasta de iodofórmio e concluíram que a pasta de iodofórmio é um material obturador de canal adequado para tratamento de sessão única de decíduos com infecção crônica da polpa.

2.2 - Hidróxido de Cálcio:

Hermann (1920) apud Castagnola (1956) publicou um trabalho onde apresentou uma pasta à base de hidróxido de cálcio e solução fisiológica ("Calxyl"), como revestimento biológico de polpas expostas, relatando a boa tolerância tecidual aliada a sua ação bactericida, atribuindo-se estas propriedades ao seu conteúdo de íons hidroxila e ao pH fortemente alcalino, em torno de 12,0.

No entanto, o hidróxido de cálcio somente veio a ser estudado, histologicamente, quando Rhoner (1940) apud Maisto & Erausquin (1965) realizou o controle de 8 tratamentos em dentes humanos, após a extirpação da polpa sob anestesia e obturação dos condutos com Calxyl. Em 6 casos encontrou tecidos periodontais saudáveis com aposição de cimento na zona apical e no conduto. Em outros 10 casos em que a pulpectomia e obturação do conduto se realizou após a desvitalização pulpar com trióxido de arsênico, 7 mostraram periodonto normal, 2 mostraram uma leve inflamação com formação cementária e 1 caso com grande inflamação sem neoformação de cimento.

Utilizando canais radiculares experimentalmente infectados, de dentes de cães, Matsumiya & Kitamura (1960) realizaram um estudo histopatológico e histobacteriológico, com a finalidade de avaliar a capacidade antibacteriana e a condição dos tecidos periapicais, após o emprego de quatro desinfetantes típicos (fenol canforado, eugenol, penicilina-G-procaína e terramicina) e posterior preenchimento com

hidróxido de cálcio. A ação esterilizante dos anti-sépticos foi apenas superficial e temporária, atingindo apenas a camada superficial das paredes do canal radicular, sendo quase impossível exterminar bactérias nas partes mais profundas, ou seja, nas ramificações apicais, lacunas de cimento e túbulos dentinários. Mesmo assim, a inflamação apical repara antes da completa eliminação das bactérias nas partes mais profundas dos tecidos do canal radicular. E, à medida que a inflamação repara, as bactérias remanescentes diminuem gradualmente pela falta de suprimento. Segundo os autores, uma ampliação suficiente e limpeza adequada do canal radicular são necessárias para reduzir a infecção bacteriana e permitir a ação da medicação. Além do preparo adequado, um material obturador que promova o reparo é essencial para preencher o canal. O preenchimento com a pasta de hidróxido de cálcio provou ser efetivo, uma vez que observou-se o desaparecimento progressivo de bactérias nos canais radiculares, acelerando o processo de reparo dos tecidos periapicais.

Heithersay (1970) desenvolveu estudo sobre a aplicação clínica do hidróxido de cálcio no tratamento de dentes despulpados, mostrando que esta substância pode ser usada para estimular o reparo periapical de lesões extensas, no controle do exsudato periapical e reabsorção apical e para induzir a formação radicular em dentes despulpados com rizogênese incompleta. Foi observado que, após a terapia endodôntica conservativa, o reparo ósseo periapical ocorreu, revelando não haver necessidade de tratamento cirúrgico complementar. O autor relatou que o efeito do hidróxido de cálcio no controle do exsudato periapical pode

ser atribuído à redução da permeabilidade capilar pelos íons cálcio. No tratamento de lesões periapicais extensas, recomendou que o canal fosse preenchido com hidróxido de cálcio e controlado radiograficamente a cada três meses e, ao haver a reparação, substituí-lo por um material obturador mais estável.

Fisher (1972) avaliou o efeito de uma pasta aquosa de hidróxido de cálcio colocada sobre a dentina cariada em dentes permanentes, a fim de determinar a viabilidade dos microrganismos. Os resultados mostraram que microrganismos viáveis não foram encontrados em dentina cariosa previamente infectada de dentes permanentes vitais, quando expostos a uma pasta de hidróxido de cálcio puro e água, por um período de 6 meses.

A fim de selecionar uma substância que desse ao hidróxido de cálcio a cor, a fluidez e a radiopacidade necessária para que o mesmo fosse visualizado radiograficamente e que não contivesse substância irritante, Andrade (1973) testou várias substâncias junto com o hidróxido de cálcio, para verificar qual delas corrigiria esses inconvenientes. As substâncias foram divididas nos seguintes grupos: (1) hidróxido de cálcio e propilenoglicol; (2) hidróxido de cálcio, óxido de zinco e propilenoglicol; (3) hidróxido de cálcio, sub-carbonato de bismuto e propilenoglicol; (4) cones de guta-percha; (5) hidróxido de cálcio, iodofórmio e propilenoglicol; (6) cone de prata. Os resultados mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio, subcarbonato de bismuto e propilenoglicol foi a que satisfaz melhor os requisitos de radiopacidade, fluidez e cor. O autor aconselhou o uso desta

pasta nos casos de biopulpectomias em dentes de adulto ou de jovem com rizogênese incompleta. Por sua vez, a pasta de Maisto, com iodoformio, deveria ser utilizada nos casos de necrose pulpar e rizogênese incompleta.

Analisando o emprego do hidróxido de cálcio em uma base de metilcelulose, Heithersay (1975) recomendou e justificou o uso do hidróxido de cálcio como curativo em onze condições patológicas: (1) controle de exsudato periapical; (2) lesões periapicais extensas; (3) curativo de rotina na terapia endodôntica; (4) curativo intracanal prolongado; (5) controle de reabsorção inflamatória apical; (6) reabsorção radicular inflamatória externa após trauma dental (luxação ou reimplante); (7) controle da reabsorção radicular interna na região apical; (8) controle de defeitos de reabsorção interna/externa; (9) manuseio de perfurações iatrogênicas; (10) tratamento de fraturas radiculares horizontais; e, (11) formação do ápice em dentes despulpados com rizogênese incompleta. Os possíveis mecanismos de ação foram discutidos: o efeito do pH do hidróxido de cálcio sobre o tecido inflamado e bactérias; o possível papel dos íons cálcio sobre os capilares e o envolvimento de sistemas enzimáticos cálcio-dependente no processo de calcificação. O pH alcalino (12.2) pode ter vários efeitos. Como o processo de inflamação envolve uma reação ácida, o hidróxido de cálcio poderia atuar como um tampão local, resultando em efeito favorável sobre o reparo ósseo. Por sua vez, o alto pH poderia explicar seu forte poder bactericida. Geralmente, microrganismos não podem sobreviver a um pH de 9,5 e apenas raros microrganismos podem sobreviver a um pH igual a 11,0 ou maior. Sua ação pode ser puramente pelo efeito irritante de um álcali forte,

com células na área imediata sendo destruídas e as células mais distantes sendo estimuladas a responder com calcificação. Os íons cálcio podem resultar na formação de tecido duro por exercer uma ação positiva sobre os novos capilares do tecido de granulação. A alta concentração de íons cálcio resultaria em menor permeabilidade das junções capilares e contração dos esfíncteres pré-capilares, resultando em menor fluxo plasmático. Isto seria importante no controle do exsudato periapical e, provavelmente, favoreceria uma resposta de calcificação no tecido envolvido. A matriz colágena poderia ser o principal fator na calcificação e os íons cálcio poderiam estar relacionados às reações enzimáticas na síntese de colágeno. Uma enzima envolvida nos processos de produção de energia é a pirofosfatase, a qual é íon cálcio-dependente. O pirofosfato é irreversivelmente alterado para ortofosfato pela pirofosfatase. Se a presença de uma alta concentração de íon cálcio aumenta a ação da pirofosfatase, deveria deduzir-se que também aumentaria a utilização de energia e favoreceria os mecanismos de defesa e reparo. O uso desse material nas situações clínicas apresentadas pelo autor simplificaria o tratamento e favoreceria o reparo do tecido conjuntivo.

Maisto (1975) relatou que o hidróxido de cálcio é um pó fino, branco e inodoro, o qual se obtém por calcinação do carbonato de cálcio. Sua solubilidade é de 1,2g por litro de água a 25°C e diminui com o aumento da temperatura. Seu pH fortemente alcalino é de 12,8. Dissolvendo-o em água até a saturação e filtrando-o se obtém a água de cal, que é transparente. Quando há excesso de hidróxido de cálcio em suspensão na água, se forma um líquido leitoso e espesso, chamado leite de cal.

Eliminando-se a quantidade necessária de água ou agregando-se mais hidróxido de cálcio se consegue uma pasta da consistência apropriada para uso endodôntico. Em contato prolongado com o CO_2 do ar ou água, o hidróxido de cálcio sofre carbonatação, inativando-o, pela perda de sua ação intensamente alcalina. A sua ação bactericida está limitada à zona de contato com as bactérias ou tecido infectado, uma vez que a bactéria não sobrevive em pH tão elevado. O hidróxido de cálcio provoca hemólise e coagula as albuminas na zona superficial do tecido pulpar, sobre o qual for aplicado, necrosando-o. Abaixo dessa zona necrótica, a polpa cicatriza formando nova camada de dentina.

Segundo Bazerque (1976) o hidróxido de cálcio é ligeiramente solúvel em água (1:630) e insolúvel em álcool. O cálcio é um metal alcalino-terroso e, portanto, muito ativo, por isso não se encontra livre na natureza. A maior proporção se encontra como carbonato de cálcio, principalmente na pedra calcária, giz e mármore de onde são extraídos os compostos de cálcio. O hidróxido de cálcio é uma substância cáustica e, como tal, produz necrose dos tecidos sobre os quais atua, por diferentes mecanismos. Os alcalinos desnaturam as proteínas e as solubilizam, causando uma cicatriz do tipo brando e sua ação é menos limitada, devendo graduar-se seu efeito pela concentração na água do veículo, de acordo com a capacidade tampão dos tecidos. Para exercer ação cáustica, o hidróxido de cálcio deve estar mais concentrado, geralmente em proporção maior que 5%. Assim, deve ser usado em forma de suspensões ou preparados de consistência pastosa.

Apesar de apresentar excelentes propriedades, o hidróxido de cálcio, segundo Leonardo et al. (1976), deixa muito a desejar em relação às suas propriedades físico-químicas pelas seguintes características: ser radiolúcido; ser permeável aos fluidos teciduais, sendo rapidamente reabsorvido na região periapical e solubilizado no interior do canal radicular; não possuir viscosidade e aderência; ter pouco escoamento, tornando difícil sua colocação no interior do canal radicular e em contato com o coto pulpar ou com os tecidos periapicais. Assim sendo, salientam que a agregação de outras substâncias ao hidróxido de cálcio tem a finalidade de: manter o estado pastoso da associação; possibilitar seu armazenamento; oferecer um bom escoamento; manter o pH próximo de 12; apresentar radiopacidade satisfatória; permitir condições clínicas de uso; não alterar suas excelentes qualidades biológicas.

Utilizando soluções de hidróxido de cálcio em diferentes concentrações, Ferreira et al. (1978) realizaram estudos *in vitro*, para avaliar seu poder bactericida e bacteriostático sobre os microrganismos existentes no interior dos canais radiculares, oriundos de polpas necrosadas. A seguir realizaram pesquisa *in vivo* utilizando, como curativo de demora, uma solução de hidróxido de cálcio a 10%, em dentes despulpados previamente instrumentados e irrigados alternadamente com soro fisiológico. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio a 5%, quando aplicado por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, apresentou testes bacteriológicos positivos; a 10%, somente no período de 30 minutos o hidróxido de cálcio revelou-se ativo, conferindo resultados negativos; e, quando utilizado a 20%, todas as

culturas foram negativas após 30 minutos. Concluíram que a concentração de hidróxido de cálcio é inversamente proporcional ao tempo de contato com os microrganismos e que, nos estudos *in vivo*, não foi verificada resposta inflamatória em termos de sintomatologia.

Vernieks & Messer (1978) realizaram tratamento endodôntico de 78 dentes não vitais com lesões periapicais, com o propósito de investigar a ação do hidróxido de cálcio ("Pulpdent" - hidróxido de cálcio associado a metilcelulose) quando utilizado como curativo de demora, antes da obturação final. Os resultados mostraram que 66,7% revelou progressão de cura ou foram totalmente reparadas dentro de 12 meses da colocação da pasta de hidróxido de cálcio. Num período de 18 meses, 79,5% repararam ou mostraram progressão de cura e apenas 3 casos foram considerados insucesso necessitando de tratamento cirúrgico complementar. Concluíram que esta técnica estimula a formação de uma base apical firme, a qual melhora o prognóstico da obturação final do canal radicular.

Com a finalidade de avaliar o reparo periapical após instrumentação dos canais radiculares, Holland et al. (1979) realizaram um estudo, em dentes de cães. Os canais foram divididos em dois grupos e instrumentados 2mm além dos ápices, até as limas de número 40 (grupo I) e 80 (grupo II). Após irrigação com solução salina e secagem com pontas de papel absorvente, os canais receberam um curativo com solução de corticosteróide-antibiótico por uma semana. Na segunda sessão foram preenchidos com uma pasta de hidróxido de cálcio e água destilada, com o cuidado de não forçar o material além dos ápices. Após 90 dias, os animais

foram sacrificados e as peças processadas para análise histológica. Os resultados foram melhores no grupo onde os canais foram instrumentados até a lima número 80, apesar de se esperar um maior trauma nos tecidos periapicais desse grupo. Isso pode ser devido à melhor adaptação do hidróxido de cálcio no coto pulpar, limpeza mais efetiva do canal e com o diâmetro aumentado do forame apical, o curativo controlaria melhor a reação inflamatória provocada pelo trauma. O fechamento parcial ou invaginação de tecido conjuntivo nos canais principais foi observado nos dois grupos. Esse fechamento geralmente ocorreu nos casos de sobreobturação com hidróxido de cálcio, a qual é mais freqüente no caso de ápices mais amplos. Não foram observadas lesões patológicas quando os canais foram sobreinstrumentados.

Utilizando dentes despulpados de cães, Holland et al. (1979) investigaram o aspecto histológico do efeito do hidróxido de cálcio no tratamento destes dentes, afirmando que este estimula o reparo dos tecidos periapicais e pode ser melhorado pela adição de certas substâncias, como o paramonoclorofenol canforado que mostrou menor grau de reabsorção por ser um veículo oleoso e, portanto, insolúvel em água. Quando o hidróxido de cálcio foi misturado à água destilada foi mais facilmente reabsorvido. Pôde-se concluir que a composição da pasta de hidróxido de cálcio pode influenciar o grau de absorção, podendo permitir a invaginação de tecido no forame apical.

Holland et al. (1981) realizaram estudo comparativo e a longo prazo, da reação tecidual provocada por agentes agressores especialmente,

materiais de obturação, assim como a velocidade de reabsorção de seu excesso. Foram empregados nesse estudo, dentes anteriores e pré-molares de cinco cães adultos, jovens e sem raça definida. Em cada período experimental foram sobreobturadas 5 raízes com um dos materiais: cimento de óxido de zinco e eugenol, cimento de Grossman, pasta anti-séptica de Maisto, hidróxido de cálcio associado à água destilada e hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio (partes iguais) e água destilada. Os materiais foram levados ao interior dos canais com espirais de lentulo, procurando-se obter uma pequena sobreobturação. Complementou-se a obturação com um cone de guta-percha previamente ajustado ao conduto, levando até as proximidades do terço apical. Os animais foram sacrificados com obtenção das peças histológicas aos 7, 15, 30, 120 e 180 dias pós-operatório. Observou-se que com o uso do hidróxido de cálcio puro ou associado ao iodofórmio, houve depósito de cimento na superfície dos cotos pulpare dos pequenos condutos que compõem o delta apical, preservando sua vitalidade. Com os outros materiais obturadores observou-se necrose de grande parte desses cotos pulpare. Concluíram que: (1) a maioria dos casos, incluindo os do grupo controle (sobreinstrumentados sem obturar), mostraram reação tecidual com infiltrado inflamatório tipo crônico, macrófagos e células gigantes tipo corpo estranho. Observou-se reabsorção óssea e cementária em graus variados. Nos períodos mais prolongados houve tendência à reparação, com neoformação cementária a nível do ápice radicular nos três materiais usados (hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio, pasta anti-séptica de Maisto). Em dois casos do

controle houve depósito parcial de cimento. O cimento de Grossman e óxido de zinco e eugenol, aos 180 dias, não permitiram o depósito de novo cimento com abundante infiltrado crônico na zona periapical. Apenas duas das 140 raízes, uma obturada com hidróxido de cálcio e a outra com hidróxido de cálcio-iodofórmio, aos 180 dias, levou ao fechamento biológico completo do ápice radicular. Estes materiais foram os que provocaram menor dano ao tecido conjuntivo periapical; (2) além do poder irritante e da presença de corpo estranho, exercida por cada um dos materiais utilizados, observou-se diferença na velocidade de reabsorção: a eliminação mais rápida ou mais lenta do material obturador manteve relação direta com a rapidez ou lentidão da neoformação cementária; (3) obstáculos para a rápida reparação: a pulpectomia em dente são, o traumatismo provocado pelo preparo cirúrgico e a ação direta do material obturador sobre o tecido conjuntivo periapical; (4) é preciso tempo mais prolongado para conhecer a reação à distância da injúria provocada.

Anthony et al. (1982) avaliaram e compararam o pH de uma pasta produzida pela mistura de pó de hidróxido de cálcio com três veículos diferentes: cresatina (metacresilacetato), paramonoclorofenol canforado ou solução salina. Ao misturar hidróxido de cálcio com a cresatina há produção de cresilato de cálcio e ácido acético. Este se dissocia liberando íons hidrogênio, diminuindo o pH. A associação hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado produz paraclorofenolato de cálcio, que é um sal. Em solução com a água, o sal adquire e incorpora o íon hidrogênio ao paraclorofenol, o que dá um excesso de íons hidroxila na água. Esse

excesso tende a aumentar o pH. Nenhuma das pastas produziu um pH maior que 9,6. O osteoclasto, em sua função reabsortiva, atua em meio ácido. O pH ácido favorece o estado ionizado do íon cálcio. A adição de um material alcalino a este fluido extracelular, teoricamente, favoreceria a redução da atividade reabsortiva, devido ao efeito reduzido do ácido láctico e hidrolases ácidas. O meio alcalino também favoreceria a formação de calcificação. O mecanismo de ação da pasta de hidróxido de cálcio poderia ser parcialmente dependente do seu alto pH. Os resultados deste estudo indicaram que o pH mais elevado foi obtido quando o paramonoclorofenol canforado ou a solução salina foram usados como veículos e o pH mais baixo foi obtido com a cresatina. Segundo os autores, devido ao alto potencial de irritação do paramonoclorofenol canforado, a solução salina seria uma escolha lógica para misturar com o pó de hidróxido de cálcio e ser utilizado como pasta obturadora temporária.

Di Fiore et al. (1983) testaram o efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio com quatro veículos diferentes: paramonoclorofenol canforado, acetato de metacresila, metilcelulose e água. Culturas de *Streptococcus sanguis* (anaeróbio facultativo, Gram-positivo) foram reconstituídas em laboratório e colocadas em placas de ágar sangue. Cinco cilindros com 10 mm de comprimento por 8 mm de diâmetro foram colocados nas placas e receberam as pastas com os diferentes veículos e foram selados com "Cavit". O cilindro controle recebeu apenas o "Cavit". As placas foram então incubadas anaerobicamente e os halos de inibição medidos nos intervalos de 2, 4, 6 e 8 dias. Os resultados mostraram que as

pastas de hidróxido de cálcio com água destilada e o "Pulpdent" (hidróxido de cálcio em metilcelulose) e o controle não apresentaram halo de inibição. Tal fato apenas foi evidenciado nas pastas com o paramonoclorofenol canforado e acetato de metacresila, os quais diminuíram com o tempo, sendo que a menor redução ocorreu com a pasta contendo o paramonoclorofenol canforado. Os autores concluíram que essas duas pastas são capazes de difusão e, portanto, de expandir o seu efeito antibacteriano.

Stevens & Grossman (1983) ressaltam que o hidróxido de cálcio estava sendo usado em razão do seu alto pH (12,2). Visto que os microrganismos comumente isolados de canais radiculares não deveriam ser capazes de crescer nesse meio, os autores realizaram um estudo para determinar o potencial antimicrobiano do hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Concluíram que o hidróxido de cálcio, em solução, ou lama de cal ou como pasta ("Pulpdent") não foi tão efetivo na destruição de *Streptococcus faecalis* em dentes de gato ou *in vitro*, quando comparado com o paramonoclorofenol.

Para verificar a influência do veículo oleoso ou aquoso sobre o processo de reparo dos tecidos periapicais, após tratamento endodôntico com hidróxido de cálcio, Holland et al. (1983) realizaram estudo em dentes de cães com vitalidade pulpar e os resultados histológicos foram analisados após 90 dias. Observaram que houve selamento biológico do forame apical através da deposição de tecido duro quando se utilizou o veículo oleoso ("Lipidiol"), ao passo que com o veículo aquoso ("Telebrix"), os achados

histológicos revelaram reabsorção do material obturador e a invaginação, para dentro do canal radicular, de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório crônico. Segundo os autores, talvez, o "Lipidiol", por não ser solúvel em água, dificultou ou impediu a fagocitose e dissolução do material melhorando as propriedades do hidróxido de cálcio. Provavelmente o veículo oleoso transforma o hidróxido de cálcio em um material menos solúvel nos fluidos orgânicos na região periapical, dificultando sua reabsorção.

Bystrom et al. (1985) investigaram clinicamente o efeito bactericida do hidróxido de cálcio, fenol canforado e paramonoclorofenol canforado, como curativo intracanal, após tratamento endodôntico de 65 dentes unirradiculares com lesões periapicais. Amostras bacterianas foram tomadas após o preparo do canal radicular por meio de pontas de papel absorvente e transferidas para um tubo contendo o meio PYG ("peptone yeast glucose"). Após um mês, para os canais preenchidos com hidróxido de cálcio, e duas semanas mais tarde, para aqueles contendo os dois outros medicamentos, os canais foram irrigados com solução salina e realizada a coleta das amostras. Todas as amostras foram cultivadas sob condições de anaerobiose e o número de bactérias determinado. Foi observado que após utilizar como curativo de demora uma pasta de hidróxido de cálcio ("Calasept"), obteve-se cultura positiva somente em 1 dos 35 canais radiculares tratados. Após o uso do paramonoclorofenol canforado ou fenol canforado como curativo, obteve-se colheita de bactérias de 10 dos 30 canais tratados. As bactérias isoladas eram predominantemente Gram-positivas e anaeróbias. Os resultados indicaram que a pasta de hidróxido de

cálcio teve um maior efeito antibacteriano no canal radicular do que o fenol canforado e o paramonoclorofenol canforado. Concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio como curativo, em canais radiculares cuidadosamente instrumentados e irrigados, elimina as bactérias tão eficientemente, que o tratamento endodôntico de canais radiculares infectados pode ser completado em duas sessões.

Safavi et al. (1985) compararam os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio com os do iodo-iodeto de potássio, utilizando culturas obtidas de canais radiculares após o completo preparo e antes da obturação do canal. Os resultados mostraram menor número de culturas positivas quando o hidróxido de cálcio foi utilizado, atingindo 77,4% de culturas negativas. Concluíram que o hidróxido de cálcio deveria ser levado em consideração para uso rotineiro como medicação intracanal em Endodontia.

Lopes et al. (1986) realizaram um trabalho a fim de discutir o mecanismo de dissociação iônica do hidróxido de cálcio, quando associado ao azeite de oliva, assim como seu provável mecanismo de ação e analisaram os resultados clínico-radiográficos obtidos com o emprego desta associação nas seguintes situações: (1) curativo de demora em lesões periapicais extensas; (2) reimplantes; (3) rizogênese incompleta; (4) fraturas radiculares; (5) perfurações radiculares; e, (6) reabsorção radicular. Concluíram que o azeite de oliva confere à pasta de hidróxido de cálcio uma dissolução lenta de íons cálcio e hidroxila, favorecendo o mecanismo de reparação e evitando-se constantes renovações do hidróxido de cálcio.

Quackenbush (1986) realizou trabalho *in vitro* verificando a ação do monoclorofenol, iodo-iodeto de potássio e hidróxido de cálcio sobre bactérias anaeróbias. Frente aos resultados obtidos, afirmou que o hidróxido de cálcio é mais efetivo contra bactérias anaeróbias facultativas (*Streptococcus sanguis*) e anaeróbias estritas (*Peptostreptococcus sp*) enquanto os outros dois medicamentos não são efetivos contra as bactérias anaeróbias.

Segundo Vazquez (1987) o pH fortemente alcalino do hidróxido de cálcio produz um meio favorável à remineralização da dentina, pois neste meio alcalino a enzima fosfatase libera ativamente a fosfatase inorgânica do sangue, permitindo posterior precipitação de fosfato de cálcio. Existem também controvérsias sobre qual seria o elemento que estimula a calcificação: segundo alguns autores, os íons cálcio são os responsáveis por esta estimulação; outros citam o pH como fator determinante para que haja reparação dentinária; e outros afirmam que a concentração de íons hidroxila seria o fator decisivo nas trocas iniciais. A alta concentração de íons cálcio diminui a permeabilidade capilar e, em consequência, têm poder anti-exsudativo, com o que favorece a reparação e diminui a dor pós-operatória. Além disso, o pH fortemente alcalino produz ação bactericida local, matando as bactérias por contato, já que a vida bacteriana é incompatível com um pH tão elevado.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar sobre o reparo de lesões periapicais, Bystrom et al. (1987) realizaram estudo utilizando técnica anaeróbia. Setenta

e nove dentes unirradiculares foram divididos em três grupos e tratados da seguinte maneira: grupo I (11 dentes) foi instrumentado e irrigado com solução salina em 4 sessões, não recebendo nenhuma medicação. Os dentes que mostraram resultado microbiológico negativo foram obturados. Sete dentes onde bactérias persistiram após esse tratamento receberam medicação intracanal de pasta de hidróxido de cálcio por 1 ou 2 meses. A obturação dos condutos somente foi realizada após exame microbiológico negativo. O grupo II (42 dentes) que foi instrumentado e irrigado com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e 5% e combinados com solução de ácido etileno diamino tetracético a 15% (EDTA), também não recebeu nenhum medicamento intracanal entre as sessões. Destes, bactérias foram eliminadas de 32 canais radiculares, sendo que em 7 deles, a obturação foi realizada sem a utilização de medicação e, em 25 dentes, a pasta de hidróxido de cálcio foi necessária pelo período de 1 mês. Em 10 canais, onde as bactérias persistiram, foi necessário o emprego da medicação por até 2 meses. O grupo III incluiu 26 canais que tinham sido instrumentados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 e 5% e medicados com hidróxido de cálcio após a primeira sessão. A medicação foi removida após 1 mês e a coleta microbiológica foi realizada. Os canais foram secos e selados com cimento de óxido de zinco e eugenol sem medicação. A próxima sessão foi realizada entre 2 e 4 dias após, para nova coleta microbiológica, quando então os canais receberam nova medicação de hidróxido de cálcio e foram selados, sucessivamente, até que nenhuma bactéria pudesse ser isolada, procedendo-se à obturação dos condutos. O acompanhamento foi feito até 6

e 12 meses após a obturação e, novamente, um ano após. Sete dentes necessitaram de intervenção cirúrgica e desses, 6 foram examinados histologicamente, demonstrando a presença de *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Arachnia propionica*. Das 79 lesões, cujos diâmetros variavam entre 1 e 12 mm, 67 repararam completamente. Na maioria dos casos, o tamanho das lesões diminuiu para 2 mm ou menos dentro de 2 anos, independente do tamanho inicial, mas em 7 casos não houve o reparo completo nesse período. Apenas 5 lesões mostraram pequena ou nenhuma diminuição no tamanho e foram submetidas a cirurgia. As lesões remanescentes não reparadas, segundo os autores, eram decorrentes do estabelecimento de infecção extra-radicular.

Cohen & Lasfargues (1988) realizaram estudo para examinar o grau de carbonatação do hidróxido de cálcio usando métodos químicos quantitativos para determinar as alterações do material causadas pelas suas condições, manipulação e seu envelhecimento antes do uso. Verificaram que, durante as primeiras horas, a carbonatação do pó seco de hidróxido de cálcio, mesmo quando mantido exposto ao ar, foi completamente insignificante. E, mesmo o fato do hidróxido de cálcio em pó ser armazenado em um frasco tampado, o qual era deixado aberto periodicamente por curtos períodos de tempo, não afetou sua pureza. Assim, o hidróxido de cálcio como usado na clínica permanece não carbonatado e ativo por um longo período de tempo. Por outro lado, quando o hidróxido de cálcio foi deixado por um longo período de tempo em um frasco aberto, a carbonatação atingiu 30% após 1 mês, no entanto, o pH das

suspensões deste material permaneceu o mesmo (12,5). O hidróxido de cálcio permanece ativo mesmo atingindo 30% de carbonatação, preservando suas propriedades. Observaram que o valor do pH de uma suspensão de hidróxido de cálcio não alterou com o aumento no conteúdo de carbonato do pó, mesmo atingindo 30%, e o hidróxido de cálcio permaneceu ativo preservando as suas propriedades anti-inflamatória, anti-exsudativa e bactericida. Afirmam ainda que é pouco provável haver a carbonatação do hidróxido de cálcio quando este encontra-se em situação anaeróbia, dentro do canal, como uma obturação temporária e bem selada. Portanto, a formação de carbonato em condições de rotina não parece ser responsável pela variação às vezes observada nos resultados clínicos. Provavelmente, a dissolução e perda de atividade do material pode ser devido ao estado ecológico do canal e os fatores que podem influenciar a eficácia da medicação podem ser os fluidos teciduais, sangue e exsudato inflamatório.

O reparo de lesões periapicais extensas também foi estudado por Sahli (1988), por meio de avaliação clínica e radiográfica do tratamento de canais radiculares sobreobturados intencionalmente com hidróxido de cálcio em trinta e sete dentes com grandes lesões periapicais (7 mm de diâmetro ou mais). Os canais radiculares foram preparados, irrigados e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio composta de hidróxido de cálcio (2,5 g), sulfato de bário (2,5 g), colofônia (0,05 g) e polietileno glicol 400 (0,05 g). O medicamento permaneceu no interior dos canais radiculares por 15 dias, quando realizou-se a obturação com guta-percha e cimento. A

observação dos resultados foi efetuada quando decorridos 6 meses, 1 ano e 3 anos e constatou-se evolução favorável em 31 dentes (83,78%), enfatizando que a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio contribuiu para a desinfecção da zona apical, favorecendo o processo de reparo.

Ranta et al. (1988) relataram o sucesso obtido na eliminação de *Pseudomonas aeruginosa* presente em infecção no canal radicular de dente humano, refratária ao tratamento endodôntico, com persistência de exsudato após várias sessões de preparo dos canais e emprego de diferentes soluções irrigadoras. Após realizado o isolamento absoluto, a antiseptia do campo operatório e acesso, o canal foi irrigado com soro fisiológico e a amostra bacteriológica obtida por meio de cones de papel absorvente e inoculada em placa de ágar sangue. A *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada em placas que cresceram em aerobiose e em 5% de CO₂ em cultura pura. As placas em anaerobiose não mostraram crescimento. O canal foi instrumentado até o instrumento 80, irrigado com etanol a 70% por alguns minutos, seguido de irrigação com soro fisiológico, secagem, preenchimento com pasta à base de hidróxido de cálcio e selamento com "Cavit[®]". Após 6, 10 e 30 dias, o canal era irrigado novamente com soro fisiológico, as paredes instrumentadas com lima 80 e nova coleta microbiológica obtida, permanecendo o hidróxido de cálcio como curativo intracanal. Nenhuma das amostras revelou crescimento bacteriano com os sintomas desaparecendo logo após a primeira sessão de curativo intracanal. Uma vez obturado, radiografias de controle foram tomadas 1 e 3 anos após, permanecendo o dente assintomático e nenhuma alteração foi

observada. Concluíram que o pH mínimo do hidróxido de cálcio para matar a *P. aeruginosa* foi acima de 10 e a infecção do canal por esse microrganismo pode ser tratada satisfatoriamente com adequado preparo químico-mecânico e medicação local.

Hasselgren et al. (1988) utilizaram 70 peças de tecido muscular de suínos, com o intuito de avaliar, *in vitro*, os efeitos do hidróxido de cálcio e da solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, isolados ou em associação, sobre a dissolução de tecido necrótico. As peças foram divididas em grupos de 10 cada, de modo que, no grupo 1, as peças eram armazenadas em 20 ml de pasta de hidróxido de cálcio e água; nos grupos 2 e 3, armazenados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, sendo que no grupo 2, a mesma solução foi mantida e, no grupo 3, a solução era renovada a cada 30 minutos até a completa dissolução da peça. Nos grupos 4, 5 e 6, as peças foram colocadas em 20 ml de pasta com hidróxido de cálcio e água e, após 30 minutos no grupo 4, 24 horas no grupo 5 e 7 dias no grupo 6, eram transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. No grupo 7, as peças foram armazenadas em 20 ml de solução salina isotônica. Todas as peças foram secas em papel filtro e pesadas após 30, 60 e 90 minutos, 10 e 24 horas. Completado esse tempo, o experimento prosseguiu por mais 12 dias até que todo o tecido fosse dissolvido. Os autores observaram que a ação dissolvente de tecido do hidróxido de cálcio é semelhante a do hipoclorito de sódio, porém, menos intensa, e que a presença prolongada do hidróxido de cálcio no canal radicular, onde desempenharia um efeito terapêutico contínuo, pode amplamente compensar esse fato. Verificaram

também, que o efeito dissolvente do hipoclorito de sódio a 0.5% foi aumentado pelo pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Com o objetivo de observar qual a porcentagem de êxito que poderia ser obtida após o tratamento de dentes humanos com lesões periapicais, Souza et al. (1989) realizaram um estudo seguindo a técnica de tratamento com hidróxido de cálcio definida em pesquisas anteriores em dentes de cão e macacos. Após o preparo, 50 canais radiculares foram preenchidos com pasta à base de hidróxido de cálcio, procurando-se sempre realizar uma pequena sobreobturação. Vinte e cinco dentes foram medicados com hidróxido de cálcio associado a água destilada e vinte e cinco dentes com hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado e glicerina. Após 2 semanas foi feita a troca da pasta de hidróxido de cálcio, a qual foi repetida após intervalos de, no mínimo, 30 e, no máximo, 60 dias, ocasião em que eram feitas tomadas radiográficas para comparação com as radiografias iniciais. Nas trocas evitou-se o extravasamento da pasta. Quando a imagem da área radiolúcida desaparecia ou ficava reduzida a um simples espessamento do ligamento periodontal apical, a pasta de hidróxido de cálcio era removida e os canais radiculares obturados. Os resultados obtidos foram semelhantes para as duas pastas. Dos 50 casos, em 47 (94%) ocorreu desaparecimento da área radiolúcida. Dentre estes, 44 casos exibiram reparação completa após um período de 4 a 12 meses. Não foi possível correlacionar o tamanho da lesão com o período gasto na sua reparação. Em 3 casos de lesões com o diâmetro maior que 10 mm, a diminuição da lesão para um simples

espessamento do ligamento periodontal apical só ocorreu após 1 ano do início do tratamento. Apenas em 3 casos (6%) as lesões periapicais mostraram-se irreversíveis ao tratamento instituído, o qual foi complementado cirurgicamente. Concluíram que a obturação temporária de canais radiculares com hidróxido de cálcio, cujos dentes eram portadores de rarefação periapical, conduz a uma elevada porcentagem de reparo clínico-radiográfico.

Haapasalo (1989) investigou a bacteriologia de infecções de 62 canais radiculares de dentes humanos, com especial atenção para a ocorrência, papel e taxonomia das espécies *Bacteroides*. Todos dentes eram unirradiculares com lesão periapical, os quais foram submetidos à coleta bacteriana antes do tratamento e após o preenchimento do canal radicular com hidróxido de cálcio. Os quarenta e dois pacientes, selecionados ao acaso, foram divididos em três grupos que receberam: (1) nenhum antibiótico; (2) penicilina V (650mg x 3) por 7 dias; (3) penicilina V por 12 semanas. Não houve diferença entre os três grupos no reparo da lesão periapical após 1 ano, fato este que sugere ser desnecessário o uso de antibiótico no início do tratamento, mas importante nos casos de persistência da infecção. Os resultados mostraram que as infecções eram mistas, exceto uma, dominadas com frequência, por bactérias anaeróbias e facultativas e, em apenas 4 casos, por bactérias facultativas. A eficácia do hidróxido de cálcio foi comprovada por meio de amostras bacteriológicas tomadas após 1 semana de sua permanência no canal radicular. A grande maioria dos *Bacteroides* foi sensível à penicilina, com apenas duas cepas

resistentes (*Bacteroides buccae* e *Bacteroides denticola*). Após o período de 1 ano, 50 casos mostraram reparação completa, 11 casos reparação parcial e, em apenas 1 caso, não houve sinais de reparo.

Tronstad et al. (1990) realizaram a monitorização de um retratamento endodôntico de dente humano, com diagnóstico de periodontite apical assintomática, cujo tratamento havia sido realizado 1 ano antes e o acompanhamento mostrou aumento da lesão. Optaram por retratar o canal radicular com a colocação de pasta de hidróxido de cálcio por um período mínimo de 3 meses, com troca após 3 semanas, objetivando maximizar a ação antimicrobiana do tratamento. Após 3 meses, o exame radiográfico mostrou que não havia qualquer alteração na região periapical, confirmando tratar-se de infecção extra-radicular. O plano de tratamento foi mudado para obturação e apicectomia com remoção cirúrgica da lesão periapical. Antes da intervenção cirúrgica, outros medicamentos intracanaís foram utilizados no intuito de debelar a infecção, tomando-se amostras microbiológicas do canal radicular e do trato fistuloso. Como o tratamento antimicrobiano local não foi efetivo, instituiu-se antibioticoterapia sistêmica com penicilina e penicilina V (500mg x 4) por 21 dias. Como a fístula não regrediu e suspeitando-se da presença de anaeróbios Gram-negativos, administrou-se metronidazole (500mg x 4) por 10 dias. Ainda assim a fístula persistiu e foi realizada a cirurgia periapical e obturação com guta-percha e cimento de Grossman, tomando-se amostras microbiológicas da fístula e da lesão periapical. Os resultados das análises microbiológicas revelaram que após a permanência do hidróxido de cálcio no canal radicular, por um período de

cento e onze dias, nenhuma bactéria foi isolada. Removendo-se o hidróxido de cálcio e selando-se o canal radicular vazio por mais 11 dias, 6 espécies bacterianas foram isoladas. A seguir, o medicamento foi novamente colocado no canal radicular por 21 dias e a coleta microbiana não revelou crescimento bacteriano. Novamente deixando o canal vazio por 14 dias verificaram mudanças na flora presente. Os resultados confirmaram que o hidróxido de cálcio efetivamente elimina as bactérias presentes no canal radicular e que este é reinfestado pelo crescimento bacteriano na lesão periapical se deixado vazio. O resultado de amostras tomadas diretamente da lesão revelaram que das 6 espécies identificadas inicialmente, quatro foram eliminadas pelo tratamento local e sistêmico e apenas duas espécies persistiram, *Streptococcus sp* e *Peptostreptococcus sp*, ambos sensíveis à penicilina, justamente aquelas encontradas no trato fistuloso. O exame microscópico da lesão mostrou tratar-se de um granuloma apical e o reparo ocorreu normalmente após 6 meses.

Holland et al. (1990) desenvolveram um trabalho para observar se o acréscimo de iodofórmio ao sealapex determinaria alguma alteração no processo de reparo dos tecidos periapicais de dentes de cães após a pulpectomia, sobreinstrumentação e obturação de canal com esse material em duas proporções diferentes. Foram usadas 30 raízes de dentes de cães, divididas nos seguintes grupos experimentais: Grupo I (10 raízes), obturados com sealapex; Grupo II (10 raízes), obturados com "Sealapex" associado a 30mg de iodofórmio; Grupo III (10 raízes), obturados com sealapex associado a 112mg de iodofórmio. Após 6 meses os animais

foram sacrificados e as peças removidas para estudo. Os resultados mostraram que a baixa incidência de selamentos biológicos completos deveu-se à técnica do tratamento executada: sessão única. O acréscimo do iodofórmio ao "Sealapex", em pequena ou em grande quantidade, não modifica as suas propriedades biológicas, do ponto de vista morfológico. Diante dos resultados passaram a usar o acréscimo do iodofórmio rotineiramente, na proporção: 1/3 da pasta (=150mg de "Sealapex") para 30 mg do iodofórmio (1/6 do peso da mistura final). Concluíram que o "Sealapex" estimula o fechamento apical por deposição de cimento e a adição de iodofórmio não altera sua propriedade biológica.

Stuart et al. (1991) compararam a efetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e formocresol. Noventa dentes humanos unirradiculares extraídos tiveram seus canais radiculares instrumentados até a lima de número 50 e foram inoculados com *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* e *Bacteroides gingivalis* ou *Bacteroides fragilis*. Após o emprego dos medicamentos estudados, os mesmos foram selados e incubados por 1 hora, quando então o conteúdo dos canais radiculares foi analisado quanto ao número de bactérias viáveis e comparado com dentes inoculados que não receberam a medicação. A análise dos resultados mostrou que todos os medicamentos exibiram atividade antimicrobiana contra as bactérias inoculadas, apresentando percentuais redutores entre 64,3% e 100%. Maior efetividade contra o *Streptococcus mutans* e os *Bacteroides* foi obtida com o "Pulpdent"

e a pasta de hidróxido de cálcio tendo como veículo o soro fisiológico, do que para o paramonoclorofenol canforado e o formocresol.

Com a finalidade de avaliar o efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, em função do tempo necessário para atingir o efeito desejado, Sjögren et al. (1991), selecionaram 30 dentes humanos unirradiculares com polpas necrosadas e lesão periapical, submetendo-os ao preparo do canal radicular e preenchimento com pasta de hidróxido de cálcio. Em 12 canais radiculares, a medicação foi deixada no canal por um período de 10 minutos e, em 18 canais, por 7 dias. Amostras microbiológicas foram tomadas dos canais radiculares antes e após o preparo dos canais radiculares para determinar a população microbiana presente. Após aplicação do hidróxido de cálcio por 10 minutos ou 7 dias uma terceira amostra foi obtida. Os canais foram selados com cimento de óxido de zinco e eugenol e deixados vazios por 1 semana (12 casos) e 5 semanas (18 casos), obtendo-se uma quarta e última amostra. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em todas as 30 amostras iniciais. Após o preparo, haviam bactérias em 6 dos 12 canais que iriam receber a medicação de hidróxido de cálcio por 10 minutos e em 9 dos 18 canais nos quais o medicamento permaneceria por 7 dias. Nesses 18 canais, nenhuma bactéria foi isolada nas amostras tomadas imediatamente após a remoção do hidróxido de cálcio nem nas amostras finais, 5 semanas mais tarde, onde permaneceram sem o medicamento. Nos 12 dentes onde a medicação foi colocada por 10 minutos, as bactérias persistiram em 6 canais, mostrando-se ineficiente, sendo que 13 das 14 espécies isoladas

após sua utilização eram anaeróbias e, dentre elas, o anaeróbio facultativo *Enterococcus faecalis*, presente na coleta inicial de 3 casos tratados com o hidróxido de cálcio por 7 dias, não sobrevivendo ao preparo em dois casos e, no terceiro, eliminada após o curativo. Os autores concluem que o hidróxido de cálcio é uma medicação eficiente para complementar a desinfecção de canais radiculares desde que permaneça por período não inferior a 7 dias.

Lage-Marques et al. (1992) realizaram estudo *in vitro* da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio, em função da sua utilização e importância na desinfecção dos canais radiculares dos dentes com polpa mortificada. O hidróxido de cálcio foi testado na forma pastosa e em solução, em contato direto com as cepas microbianas. O experimento mostrou que em baixas concentrações o hidróxido de cálcio não apresentou ação antibacteriana, na forma de solução, e que o efeito bactericida somente foi observado quando em concentrações elevadas, enquanto que, na forma pastosa, a ação antimicrobiana ficou vinculada à superfície de contato com as cepas testadas.

Sabendo que as lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico convencional são produzidas por bactérias anaeróbias ou são dominadas por anaeróbios, Georgopoulou et al. (1993) estudaram a efetividade do hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol sobre bactérias anaeróbias do canal radicular, em intervalos de tempo de 5, 15, 30 e 60 minutos. Os testes revelaram que o hidróxido de cálcio foi significativamente mais efetivo que o paramonoclorofenol contra o número total de

anaeróbios. Além disso, foi provado ser altamente efetivo contra alguns microrganismos relacionados a sintomas clínicos severos, tais como *B. melaninogenicus* e *P. gingivalis*, bem como contra *Actinomyces sp.*

Para comparar os efeitos de duas pastas de hidróxido de cálcio preparadas com veículos diferentes, Leonardo et al. (1993) avaliaram, histologicamente, a resposta do tecido periapical de dentes de cães, com rizogênese incompleta e lesões periapicais. Um grupo de dentes sem curativo intracanal foi usado como controle. Após indução da lesão periapical, os canais radiculares foram instrumentados e preenchidos com uma das pastas ("Calen" e "Calasept"), sendo renovados mensalmente por 90 dias. Ao final do período de observação (3 meses), os animais foram sacrificados, as peças removidas e preparadas para análise histopatológica. Ambas as pastas de hidróxido de cálcio induziram o selamento apical e reparo da região, mas a pasta "Calen" produziu melhores resultados que o "Calasept". O tecido mineralizado foi predominantemente do tipo cementóide após o uso de ambas as pastas, mas o infiltrado inflamatório foi significativamente menos intenso com a pasta "Calen". No grupo controle, a ausência de curativo no canal radicular impediu o processo de reparo periapical e não produziu fechamento apical. Os autores salientam que o polietilenoglicol 400, veículo do "Calen", devido ao seu alto peso molecular, confere menor solubilidade ao hidróxido de cálcio que a água destilada, de modo que a pasta pode liberar íons cálcio em menor proporção que a pasta "Calasept", cujo veículo aquoso causa dissociação iônica mais rápida e maior solubilidade da pasta, especialmente quando em contato com os

tecidos periapicais, o que poderia explicar a resposta inflamatória mais severa com a pasta "Calasept".

Safavi & Nichols (1993) estudaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, os quais desempenham um papel significativo no processo de reabsorção óssea em casos de periodontite apical. O tratamento do LPS com hidróxido de cálcio mostrou liberar elevadas quantidades de ácidos graxos. Concluíram que o hidróxido de cálcio hidrolisou os lipídios do LPS bacteriano, resultando na liberação de ácidos graxos livres de hidróxido. Este resultado sugeriu que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio poderia ser uma razão importante para os efeitos benéficos obtidos com o uso do hidróxido de cálcio na clínica endodôntica.

A liberação iônica da pasta de hidróxido de cálcio é determinada pelo veículo utilizado, orientando sua rápida ou lenta reabsorção. Assim sendo, Lage-Marques et al. (1994) analisaram *in vitro* a dissolução de algumas pastas à base de hidróxido de cálcio, avaliando a concentração iônica de íons hidroxila em relação ao tempo de estabilização, caracterizado pela saturação da solução. Com base nos achados experimentais, verificaram que o óleo de oliva conferiu à pasta pouca solubilidade e baixa concentração de íons hidroxila, apesar da rápida saturação da solução. A água destilada possibilitou um maior índice de concentração iônica entre todas as amostras, porém o tempo de estabilização foi alto (270 minutos). Com o soro fisiológico, o pH e a concentração iônica atingiram níveis altos em tempo bastante superior (480

minutos), comprometendo a relação concentração/tempo. Por sua vez, o PEG 400, apesar de hidrossolúvel, apresentou comportamento semelhante ao dos óleos, com dissociação lenta (1260 minutos), devido ao seu alto peso molecular, porém com níveis altos de concentração iônica. Os autores concluíram que, quando veiculado em anestésico, a estabilização do pH do hidróxido de cálcio foi alcançada em menor tempo e os menores índices de pH e concentração de hidroxila foram obtidos quando o veículo utilizado foi o óleo de oliva.

Safavi & Nichols (1994) investigaram se o tratamento do lipopolissacarídeo (LPS) com hidróxido de cálcio alteraria sua ação biológica, medida pela secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2) do monócito humano. Culturas de monócitos foram estimulados com LPS ou com LPS tratado pelo hidróxido de cálcio e os sobrenadantes das culturas foram analisados quanto ao conteúdo de PGE_2 . Foram identificadas PGE_2 nos sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS, mas não naqueles estimulados com LPS tratado pelo hidróxido de cálcio. Concluíram que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano, inativando-o, perdendo seus efeitos tóxicos.

Com o intuito de avaliar a influência do grau de ampliação apical e aplicação de hidróxido de cálcio por uma semana sobre a infecção do canal radicular, Yared & Dagher (1994) realizaram um trabalho onde utilizaram sessenta incisivos centrais superiores de humanos, com lesão periapical assintomática, sem edema ou presença de fístula. Foi realizada a cirurgia de acesso e obtida amostragem inicial da população bacteriana do

canal radicular (amostra 1). Após determinar o comprimento de trabalho os canais foram preparados até o instrumento 25 (30 dentes) e até o 40 (30 dentes). O escalonamento foi realizado até o instrumento 60 e brocas de Gates-Glidden números 1, 2, 3 e 4. Então, nova amostra foi obtida após essa etapa (amostra 2). O canal radicular foi preenchido com pasta de hidróxido de cálcio em solução aquosa e foi realizada uma tomada radiográfica. A cavidade foi selada com cimento de óxido de zinco e eugenol e, após 1 semana, o hidróxido de cálcio foi removido e foi tomada nova amostra microbiológica (amostra 3). Todas as amostras iniciais registraram crescimento bacteriano. Durante o tratamento, houve redução significativa no número de bactérias entre as amostras 1 e 2 e amostras 2 e 3. Na última coleta houve grande redução no crescimento bacteriano em ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre os dentes preparados até o instrumento 25 e 40. A presença de microrganismos detectáveis ao término do preparo do canal radicular confirmaram o conceito de que apenas a limpeza e a modelagem do canal radicular não são suficientes para torná-lo livre de bactérias. A aplicação intracanal de hidróxido de cálcio por uma semana eliminou eficientemente as bactérias do canal radicular.

Wakabayashi et al. (1994) realizaram estudo histopatológico em coelhos, utilizando-se de microscópio eletrônico de varredura e raio X microanalisador (EDX), com a finalidade de avaliar o potencial de alguns cimentos de canal radicular contendo hidróxido de cálcio, na indução de calcificação distrófica (barreira calcificada) em tecido conjuntivo. Os resultados demonstraram que houve diferença entre os quatro cimentos

contendo hidróxido de cálcio, do ponto de vista de sua capacidade de induzir calcificação distrófica no tecido conjuntivo vascular, sendo reclassificadas não pelo seu constituinte e sim pelo potencial indutor de calcificação. O "Sealapex" e o "Calvital" (hidróxido de cálcio e iodofórmio) apresentaram reação semelhante àquela produzida pela pasta de hidróxido de cálcio e solução salina, formando rapidamente uma precipitação de fosfato de cálcio no conjuntivo, induzindo calcificação. A irritação produzida por estes dois cimentos inicialmente foi atribuída a outros componentes além do hidróxido de cálcio, como por exemplo, o iodofórmio no calvital, porém a irritação foi eliminada após 4 semanas e assim foram considerados cimentos verdadeiros contendo hidróxido de cálcio. Porém, o "Dentalis KEZ" (óxido de zinco, hidróxido de cálcio e eugenol) não induz precipitação de calcificação distrófica apesar do hidróxido de cálcio, talvez devido ao eugenol. A toxicidade do "Canals" foi atribuída ao eugenol livre. Os cimentos "New A" (hidróxido de cálcio e ácido graxo) e "New B" (óxido de zinco e ácido graxo) foram desenvolvidos para eliminar a citotoxicidade do eugenol, o qual foi substituído por ácidos graxos e não tiveram quase nenhum potencial de irritação, porém sua rápida desintegração nos tecidos poderiam representar um problema clínico se o material é usado como cimento de canal radicular.

Utilizando microscopia eletrônica de varredura, Wakabayashi et al. (1995) avaliaram o efeito dissolvente da pasta de hidróxido de cálcio sobre a camada odontoblástica e a pré-dentina remanescente na parede do canal radicular após a remoção do tecido pulpar. Os espécimes do grupo de 1 semana foram armazenados por 7 dias em pasta de hidróxido de cálcio e

solução salina, sob condições de 100% de umidade e 37°C. Os espécimes do grupo de 4 semanas foram armazenados por 28 dias da mesma maneira, porém foram lavados e substituídos por nova pasta toda semana. As paredes do canal radicular destes espécimes foram comparadas ao microscópio eletrônico de varredura. Os resultados mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio dissolveu a camada odontoblástica após 1 semana de curativo e que os debris foram removidos por limpeza ultrasônica. No entanto, a pré-dentina não foi afetada e os processos odontoblásticos permaneceram intactos após 1 semana, embora a superfície estivesse erodida no grupo de 4 semanas. Essa ação limitada do hidróxido de cálcio parece ser devido ao seguinte mecanismo: a solubilidade do pó de hidróxido de cálcio em água é muito pequena (0,16g/100 g de água a 20°C) e a quantidade de íons hidroxila dissociados é pouca, embora a pasta apresente alto pH. Assim que a pasta dissolve os tecidos moles, os íons hidroxila são consumidos e as substâncias neutralizadas acumulam na parede do canal impedindo a transferência de novos íons hidroxila. Os autores concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio dissolveu a camada de células odontoblásticas, mas não teve efeito sobre a pré-dentina. Portanto, tal pasta teria eficácia clínica para limpeza e desinfecção se todo o canal for preenchido com a mesma.

Tem sido sugerido que o principal benefício do uso do hidróxido de cálcio como medicamento intracanal seria seu efeito bactericida, devido seu pH alto (12,5). Assim sendo, Fuss et al. (1996) estudaram o efeito *in vitro* da exposição ao CO₂, por 30 dias, sobre o pH de

diversas pastas de hidróxido de cálcio nos canais radiculares. Sessenta e dois dentes humanos unirradiculares foram preparados endodonticamente utilizando limas tipo K acima do número 60. Os dentes foram separados ao acaso em 6 grupos e os canais preenchidos com uma das substâncias: "Calxyl", "Hydrocalcium", ou uma pasta feita de pó de hidróxido de cálcio com água destilada, para-monoclorofenol canforado, solução anestésica local ou "Solvidont". A abertura coronária foi selada e os dentes foram colocados individualmente em frascos contendo 10ml de água destilada. Cinco frascos de cada grupo foram expostos ao ar à temperatura ambiente, enquanto os outros cinco frascos foram expostos ao CO₂ em ambiente fechado. O pH da pasta no canal radicular foi medido após 30 dias. Não houve alteração significativa no pH (média 13,11) das pastas colocadas nos dentes antes e após exposição ao ar, enquanto o pH das pastas nos dentes expostos ao CO₂ foi significativamente reduzido (média 12,54). Não houve diferença estatística significativa no pH entre as seis preparações. Após 30 dias de exposição ao CO₂, elas ainda mantinham um pH bactericida dentro do canal radicular.

Sydney (1996) realizou estudo com o objetivo de identificar a presença de bactérias anaeróbias nos canais radiculares de dentes portadores de polpa necrótica e lesão periapical, sem comunicação com a cavidade oral, após o preparo e emprego ou não de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio veiculada em soro fisiológico. Foram utilizados vinte dentes humanos, anteriores superiores, os quais foram divididos em dois grupos. No grupo I, a população microbiana foi coletada

para identificação e os canais radiculares instrumentados e selados sem nenhum medicamento, pelo período de 1 e 6 semanas, quando novas amostras foram coletadas. Nos dentes do grupo II, após a identificação da população microbiana, os canais radiculares foram instrumentados e receberam medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e soro fisiológico, permanecendo por um período de 1 e 6 semanas. Ao término de cada período, a pasta era removida do interior dos canais radiculares, os quais eram selados vazios por 7 dias e, novas coletas microbianas eram tomadas. Para cada dente foram realizadas três coletas, totalizando 60 amostras microbianas. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio promoveu uma redução de 77,8% na população microbiana após sua permanência por 1 semana e, após o período de 6 semanas, em apenas um caso, uma bactéria foi identificada, o *Enterococcus faecalis*, um coco facultativo Gram-positivo. Concluiu-se que havia a necessidade da manutenção da medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio por um período maior de tempo, para que a inativação enzimática das bactérias anaeróbias Gram-positivas seja realmente irreversível.

2.3. Veículos:

As pastas à base de iodofórmio e hidróxido de cálcio têm sido preparadas utilizando-se os mais variados veículos. A utilização de um veículo é necessária para facilitar a inserção da substância no interior do canal radicular e seu escoamento para a região apical. Segundo Lane &

Blank (1946) a ação físico-química de um material terapêutico depende primariamente do veículo que pode ser um elemento importante na ação desse material.

Stewart & Gautieri (1962) salientaram que os carbowax são polietileno glicóis sólidos $[\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)\text{CH}_2\text{OH}]_n$. As propriedades físicas destas ceras são influenciadas pelo seu peso molecular. As de menor peso molecular (1500 kD - quilo-dalton) apresentam a mesma consistência da vaselina e as de peso molecular 4000 kD são tão duras como a cera de abelha. Como podem misturar-se entre si é possível obter um veículo na consistência desejada. Estes compostos têm várias propriedades satisfatórias: são completamente solúveis em água; fundem à temperatura do corpo; não desidratam; são resistentes a fungos e estáveis indefinidamente. Além disso, uma das propriedades mais importantes reside em sua capacidade de dissolver certas drogas e proporcionar soluções homogêneas. Segundo o autor o polietileno glicol 1500 kD não produziu reação inflamatória no olho de coelho mesmo após 3 a 4 horas de observação.

Muitas substâncias, tais como materiais obturadores de canal, não são solúveis no meio comumente usado para o cultivo celular. A investigação do efeito tóxico de materiais obturadores de canal radicular sobre células *in vitro*, portanto, requer a solubilização dos materiais. O "Tween 80[®]" é um monooleato polioxietileno sorbitol, um éster do glicol, e foi estudado com relação a sua conveniência como emulsificador e solubilizador de materiais obturadores de canal para estudos *in vitro* do

efeito de tais substâncias sobre células humanas. Para examinar o efeito tóxico do "Tween 80[®]" *in vitro* e determinar a concentração adequada do fluido para solubilização de materiais obturadores de canal radicular, Spångberg (1969c) realizou um estudo utilizando células HeLa e fibroblastos humanos. O "Tween 80[®]" foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 2%, 1%, 0,5% e 0,1% (v/v), o que resultou na concentração final no meio de cultura de 0,57%, 0,29%, 0,14% e 0,03% (v/v). Os fibroblastos provaram ser mais sensíveis ao "Tween 80[®]" do que as células HeLa. Os resultados mostraram que em estudos *in vitro* de substâncias que necessitam de emulsificadores e solubilizadores, a adição de Tween 80[®] numa concentração final de 0,03% (v/v) pode ser usado sem afetar o número de células e a frequência de mitoses. No método aqui descrito 0,1% (v/v) de "Tween 80[®]" na solução teste provou ser suficiente para emulsificação e solubilização de substâncias obturadoras de canal radicular.

Bell (1969) relatou que, de acordo com os fabricantes, o polietileno glicol possui as seguintes propriedades: é solúvel em água e muitos solventes orgânicos; tem um ponto de fusão de 38°C a 41°C; é estável; e, tem baixa toxicidade. O autor, realizando implantes em ratos da linhagem Wistar, observou que o polietileno glicol retardou a formação de tecido conjuntivo e osso, quando comparado com o grupo onde foi feito o implante preenchido com sangue.

Segundo Bazerque (1976) o polietileno glicol ou polioxietileno glicol é um éster do glicol e pode apresentar peso molecular variando de 150

kD a mais de 10.000 kD , de acordo com o grau de polimerização. Podem apresentar-se na forma líquida, semi-sólida ou sólida. Tem a propriedade de ser solúvel em água e servir como veículo em pomadas que permitem a incorporação de medicamentos hidrossolúveis, facilmente removíveis em água. Os mais usados em Odontologia são o PEG 400 kD, o PEG 1500 kD e o PEG 4000 kD. O PEG 400 kD se apresenta como um líquido viscoso, incolor, transparente; é solúvel em água, álcool e acetona, sendo utilizado em cremes e loções para a pele e o cabelo, e também como veículo de pomadas e supositórios. Por sua vez, o PEG 1500 kD é sólido, branco amarelado; é solúvel em água e álcool e um importante veículo de pomadas hidrossolúveis. Já o PEG 4000 kD se apresenta como um sólido amorfo, duro, com o aspecto e consistência da parafina, inodoro, de coloração branco leitoso; é solúvel em água e álcool e é utilizado como o anterior para dar distintas consistências ao veículo das pomadas laváveis.

Giro et al. (1994), afirmaram que o PEG 400 kD é um veículo hidrossolúvel, com peso molecular relativamente alto, o que dificulta a dispersão do hidróxido de cálcio, mantendo-o por mais tempo na área desejada.

2.4. Estudos in vitro:

O estudo *in vitro* utilizando técnicas de cultura de células é importante para a padronização biológica de materiais dentários, permitindo

melhor controle das condições experimentais. Desde então essas técnicas têm sido empregadas para estudar o efeito citotóxico de materiais dentários.

Menegaux et al. (1934) apud Kawahara et al. (1968) relatam que o primeiro estudo *in vitro* sobre materiais implantados foi realizado no campo ortopédico. Por sua vez, na área odontológica estudos *in vitro* foram realizados por Kawahara et al. (1955) e Grant (1955) apud Kawahara et al. (1968), para avaliar a citotoxicidade de vários materiais dentários, tais como, metais, ligas, resinas sintéticas, cimentos dentários, materiais obturadores de canal e materiais de capeamento pulpar utilizando cultura de células.

O dano celular pode ser observado pela morfologia celular, efeitos de membrana, atividade celular e índice de proliferação. Assim, Bergman (1959) apud Spångberg (1969a) introduziu o método de contagem de células e de mitoses para avaliação do dano celular, onde a suspensão celular e a solução teste são misturadas em uma câmara de cultura consistindo de um anel de vidro fixada a uma lâmina. Após fixação e coloração da cultura as células e mitoses são contadas.

Por sua vez, Guess et al. (1965) apud Schmalz (1994) relataram que efeitos de membrana poderiam ser demonstrados pelo vermelho neutro, o qual é armazenado em células viáveis e liberado no meio circundante após dano celular, porém, a avaliação do dano celular por esse método é subjetiva.

Posteriormente, para avaliação da citotoxicidade do material, Spångberg (1973) introduziu o método da mensuração da liberação de um isótopo radioativo incorporado no interior das células (cromo radioativo -

^{51}Cr), baseado no dano celular após contato direto material-célula. A liberação de marcadores radioativos de células-alvo é usada para avaliação quantitativa do dano celular. Após a exposição a materiais tóxicos, ocorrerá dano celular e a liberação de DNA marcado pode ser medida para indicar o dano celular. Esse método tem sido amplamente utilizado como teste de avaliação para muitos materiais dentários e provou ser útil para comparar a citotoxicidade de materiais obturadores endodônticos, sendo um método rápido, altamente sensível, que possibilita adequado contato material-célula e permite quantificação objetiva do dano celular com boa precisão.

A Federação Dentária Internacional (1980) recomendou que a avaliação da toxicidade de materiais dentários fosse feita segundo níveis biológicos: testes iniciais, testes secundários e, finalmente, testes de uso. Dessa forma, o número de testes e de animais necessários para os testes de uso poderiam ser limitados, pela avaliação preliminar de dados dos testes iniciais. Dentre os testes iniciais mencionou os seguintes testes de citotoxicidade *in vitro*: método da liberação de cromo radioativo, método do filtro "Millipore" e teste do revestimento com ágar.

De acordo com Schmalz (1981) apud Schmalz (1994), outros métodos basearam-se na exclusão do corante (azul de Trypan), o qual penetra nas células mortas, que possuem lesão da membrana celular, enquanto isso não ocorre nas células vivas, que apresentam membrana íntegra.

Segundo Pollard (1990), a determinação do número celular poderia ser realizada usando um contador de partículas eletrônico ou por um

hemocitômetro. O primeiro é mais preciso e pode ser usado para contar baixas concentrações de células (aproximadamente 10^3 células/ml). O segundo requer maior densidade e é mais propenso a amostragem de erro, no entanto, permite uma estimativa visual do estado das células e, combinado com a exclusão do corante azul de Trypan, pode ser usado para estimar a viabilidade celular. Para a contagem as células são ressuspensas e uma gota da suspensão celular é adicionada aos dois lados do hemocitômetro. Cada quadrado dá uma área de 1 mm^2 e uma profundidade de 0,1 mm, isto é, o volume de 10^{-4} ml. Para determinar a viabilidade celular, antes de colocar as células no hemocitômetro, elas podem ser diluídas em azul de Trypan. O número de células que não se coraram, ou seja, que apresentaram a membrana intacta, pode ser determinado.

Baserga (1990) relatou que células em cultura podem crescer por aumento no tamanho da célula ou por aumento no número de células. A contagem do número de células em uma placa de Petri nos diz quanto a população celular cresceu, porém não informa se as células estão ou não proliferando. Se desejamos determinar o efeito de qualquer alteração no meio de cultura sobre a proliferação celular, isto é, sua capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método melhor e mais simples é contar o número de células antes e após o tratamento, com intervalos de 24 horas, se possível. O melhor parâmetro para indicar se uma população celular está ou não crescendo é contar o número de células por placa de cultura.

Ciapetti et al. (1996) afirmaram que embora os métodos que empregam a incorporação de nucleotídeos sejam sensíveis, apresentam algumas desvantagens, tais como: perigo de manuseio dos marcadores radioativos, uso de sala e equipamentos específicos, bem como a geração de resíduos radioativos.

Embora de valor limitado, a cultura de células pode ser um instrumento valioso na elucidação do mecanismo de biocompatibilidade de materiais dentários. A maioria dos materiais dentários tem uma composição química complexa e diferentes constituintes podem ser liberados dos materiais nas áreas circundantes. Ao investigar o mecanismo da resposta biológica a tais materiais é necessário, conforme Leirskar & Helgeland (1981), avaliar os efeitos biológicos das substâncias liberadas separadamente e em combinação, a interação destas substâncias com o meio biológico e os efeitos sinérgicos ou antagônicos de combinações destes constituintes. Aparentemente, um grupo de métodos é necessário para avaliar estes vários aspectos. Nenhum experimento isolado pode dar a resposta final aos mecanismos da resposta biológica à materiais dentários.

De acordo com Mjör et al. (1985) a citotoxicidade de materiais dentários *in vitro* foi avaliada por meio de medidas de crescimento celular, alterações na permeabilidade da membrana, alterações metabólicas ou alterações citopáticas. Alguns métodos avaliam a citotoxicidade por dois ou mais desses parâmetros. Três testes utilizados para avaliar a citotoxicidade são baseados em, alterações na permeabilidade da membrana (teste do revestimento com ágar; teste da liberação de ^{51}Cr) e em alterações

metabólicas combinadas com um corante celular e microscópio (teste do filtro Millipore). O método da liberação do ^{51}Cr , além de uma área de trabalho estéril e incubadora com controle de ar, umidade e temperatura, requer um espectrômetro gama ou um contador de cintilação líquida e um sistema de distribuição de resíduos radioativos. Se a substância teste tem a capacidade de precipitar proteínas, esse método pode indicar um resultado falso, dando uma baixa liberação de ^{51}Cr . No método do revestimento com ágar o material é colocado em contato direto com o ágar que reveste uma monocamada celular, a qual é corada com vermelho neutro vital. Ao ocorrer lise celular, registra-se um "índice de resposta" baseado no tamanho da difusão pela zona descolorida e a porcentagem das células lisadas dentro das zonas. O método do filtro Millipore registra de acordo com um escore baseado na intensidade da coloração da zona e o diâmetro ou extensão das áreas afetadas, classificando o material como não tóxico, levemente tóxico, moderadamente tóxico e severamente tóxico.

Spångberg & Pascon (1988) avaliaram a importância do preparo do material ao estudar a citotoxicidade de sete cimentos endodônticos comumente usados para obturação do canal radicular como material sólido ou em solução. Utilizaram três métodos diferentes para preparar os materiais em mistura fluida: (1) emulsificação em "Tween 80"; (2) dissolução em etanol 95% e emulsificação em "Tween 80"; (3) dissolução em clorofórmio e emulsificação em "Tween 80". A proporção foi de 240mg do material para 1,0 ml do solvente. Para os experimentos, o material dissolvido foi misturado com meio de cultura em uma concentração estoque de

4.000 µg/ml de material. As soluções estoque foram, por sua vez, diluídas em meio de cultura em menor concentração para os experimentos. As soluções foram filtradas em uma membrana de filtro com poros de 0,22 µm para eliminar as partículas sólidas. Os resultados indicaram que a forma de preparo do material é de extrema importância quando se utiliza metodologia *in vitro*. O ideal é preparar o material exatamente na forma a ser usada. No caso de cimentos endodônticos, a pasta misturada é a forma adequada. O material sólido *in vivo* entrará em contato direto com o tecido circundante onde pode haver ingestão direta do material dentro das células macrofágicas, por meio de vários processos digestivos. Isso não pode ser simulado durante a avaliação *in vitro*. Concluem que os experimentos *in vitro* e *in vivo* só podem ser comparados quando as condições de cultura e preparo do material são semelhantes. O uso de materiais solubilizados através de preparo artificial não dão respostas adequadas em relação à citotoxicidade. Tais preparações podem ser úteis ao se estudar os componentes dos materiais ou os mecanismos de toxicidade.

Freshney (1990) relatou que os ensaios com cultura de células podem ser divididos em duas classes: (1) Resposta imediata ou de curto-prazo, tal como alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica; e, (2) Sobrevivência a longo-prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto-renovação ou sobrevivência em estado alterado, como por exemplo, transformação maligna. Os ensaios de curta duração são usados para medir a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria dos testes de viabilidade baseiam-se

no rompimento da integridade da membrana, determinado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (por exemplo, azul de Trypan, eritrosina, nigrosina), ou a liberação de um corante ou isótopo normalmente retido pelas células viáveis (por exemplo, diacetato de fluoresceína ou cromo radioativo). Por sua vez, os testes a longo-prazo geralmente são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo é medir a sobrevivência. A capacidade de sobrevivência das células a uma injúria tóxica tem sido a base da maioria dos testes de citotoxicidade, uma vez que a sobrevivência implica na retenção da capacidade regenerativa da célula.

Com relação ao tipo celular a ser utilizado no experimento, Browne & Tias (1979) revisaram o tema da dependência celular sobre o resultado da citotoxicidade *in vitro*. Segundo o autor, muitos aspectos dos testes *in vitro* são relevantes para a simulação do uso clínico de materiais dentários, especialmente: o tipo de célula usado, o estado físico do material, método de contato material-célula e o método de avaliação da citotoxicidade. Apesar de ter sido argüído que os estudos de citotoxicidade deveriam ser realizados usando células homólogas ao órgão-alvo *in vivo*, concluíram que o tipo de linhagem celular experimental empregada não era um fator decisivo na determinação da toxicidade de um material.

Schmalz (1981) apud Schmalz (1994) afirmou que dois tipos de células são usados: linhagens de células permanentes derivadas de coleções tipo cultura (ou de fontes comerciais) ou linhagem de células primárias, derivadas de "explant" e estabelecidas em cada laboratório individual. O

autor relatou que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação desejada. Inicialmente, métodos mais simples, baseados nos efeitos de membrana ou no índice de proliferação celular deveriam ser usados. Posteriormente, se houver necessidade de informações mais detalhadas relativas ao mecanismo de ação tóxica, métodos mais sofisticados baseados na atividade celular deveriam ser usados. O autor mencionou que o uso do índice de proliferação para registrar o dano celular é um dos métodos mais antigos e mais comumente usados. A contagem celular direta é fácil de realizar e pode ser combinada com um corante vital a fim de excluir as células mortas.

Ao realizarem experimentos com linhagens de células permanentes e células primárias (células da gengiva, células do ligamento periodontal), Schmalz & Sharaf (1988) apud Schmalz (1994) observaram uma tendência para as células primárias serem menos sensíveis que as linhagens de células permanentes. Porém, os principais efeitos demonstrados neste teste foram os mesmos, independente do tipo de linhagem celular usado.

Eiskjaer & Arenholt-Bindslev (1994) avaliaram a sensibilidade relativa de células humanas transformadas e primárias, expostas a alterações citotóxicas idênticas. A toxicidade relativa do formaldeído, o qual é liberado de materiais dentários, foi estudada em culturas de epitélio oral humano (HE), fibroblastos pulpares de dentes humanos (HPF) e células HeLa. Dois dias após o estabelecimento as culturas foram expostas por 24 horas a diluições graduadas do formaldeído. A citotoxicidade foi avaliada

pela contagem de células e ensaios colorimétricos NR (ingestão de vermelho neutro) e MTT (teste tetrazólio). As relações dose-resposta revelaram que as células HeLa foram mais susceptíveis à alteração citotóxica do que as células HE e HPF. Além disso, concentrações mais baixas do formaldeído causaram mais dano aos lisossomos do que às mitocôndrias. Este estudo demonstrou que o tipo celular e os parâmetros de toxicidade podem influenciar os dados obtidos dos estudos de toxicidade celular.

Kawahara et al. (1968) relataram que é mais importante padronizar a área de superfície ativa da peça teste que entrará em contato com o meio de cultura do que padronizar o peso do material usado. Para conseguir essa padronização foi utilizado um tubo de polietileno de 0,6mm de diâmetro. Diversos materiais obturadores de canal radicular foram testados, dentre eles, o hidróxido de cálcio. Uma peça teste contendo pasta de hidróxido de cálcio foi destruída no meio e as partículas do hidróxido de cálcio se dispersaram, alterando o pH de neutro para 9,8. Não foram observados crescimento celular excessivo nem proliferação celular. As células foram inicialmente perturbadas a nível de membrana e mostraram formação de vesículas citoplasmáticas grandes, 20 minutos após a aplicação da pasta de hidróxido de cálcio e 24 horas após a sua manipulação, devido à destruição parcial ou permeabilidade anormal de uma parte local da membrana celular e, finalmente, sinais de degeneração e desintegração celular. Os autores concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio altera o pH do meio para alcalino e as células mostram vesículas

citoplasmáticas e degeneração. Além disso, a citotoxicidade de materiais dentários diminuiu com o passar do tempo após o preparo da substância, especialmente em materiais que tomam presa, tais como, cimentos dentários, materiais obturadores de canal radicular, materiais de capeamento pulpar e plásticos.

Para esclarecer o efeito *in vitro* de componentes solúveis em água, de diversos materiais obturadores de canal radicular, sobre a multiplicação e contagem de células He La, Spångberg (1969b) realizou um estudo. Dentre os materiais estudados foram avaliadas duas pastas de hidróxido de cálcio: "Calxyl blue" e hidróxido de cálcio associado à solução salina. Os materiais foram preparados e colocados em tubos de vidro de 0,25ml, com diâmetro da boca do cilindro de vidro de 17,7mm. Esses tubos foram submersos em meio de cultura. Após 1 e 10 dias a 37°C e 5% de CO₂, os tubos foram removidos do meio. O extrato obtido foi congelado e armazenado a -100°C. As células foram cultivadas, tripsinizadas e suspendidas de forma detalhada em um artigo prévio (Spångberg, 1969a). Um anel de vidro unido a uma lamínula com vaselina foi utilizado como câmara de cultura, onde 0,2ml da solução teste foi misturado com 0,5ml de suspensão celular ($1,5 \times 10^4$ células/ml). Após 5 horas a 37°C, o anel de vidro foi removido e a lâminula foi lavada em um solução de Parker 199 aquecida (37°C). As células aderidas à lâmina de vidro foram cultivadas por 18 horas. Ao final do crescimento foram fixadas e coradas, contando-se as células e as mitoses. O número médio de células por campo de visão e o número de mitoses foram calculados a partir das contagens registradas em

20 campos de visão por lâmina. O número médio de células por campo no grupo experimental e o número de mitoses por 100 células foram determinados. Os resultados mostraram que para 1 e 10 dias de difusão, a pasta de hidróxido de cálcio e o "Calxyl" liberaram tanta substância tóxica que essas composições tiveram de ser diluídas a 25% da sua concentração original, para evitar a inibição do crescimento celular. Também nestes experimentos a diminuição da frequência mitótica foi associada com a diminuição na contagem celular. A pasta de hidróxido de cálcio associada à solução salina e o "Calxyl" não diluídas inibiram completamente o crescimento celular.

Spångberg (1969d) avaliou o efeito de materiais obturadores de canal radicular, solubilizados e emulsificados em misturas fluidas, sobre o efeito inibitório do crescimento de células HeLa. Mesmo concentrações muito baixas das misturas foram suficientes para inibir o crescimento das células. Para o hidróxido de cálcio, cloropercha e "AH26", a menor concentração inibitória que inibiu o crescimento celular foi 0,1% (peso/volume). Além disso, observou-se que o hidróxido de cálcio foi o primeiro a perder a ação inibitória de mitoses. O efeito inibitório mais forte sobre o número de células por campo de visão foi registrado para a cloropercha seguida pelo hidróxido de cálcio. O efeito inibitório sobre o crescimento celular pode ser devido, em parte, ao alto pH e alto conteúdo de íons cálcio da cultura teste, que podem impedir a aderência das células ao vidro.

Spångberg (1969e) realizou investigação para comparar o efeito tóxico de materiais obturadores de canal radicular sobre células HeLa e fibroblastos de pele humana *in vitro* e, também, verificar em qual fase da mistura fluida localizam-se os componentes mais tóxicos, após emulsificação e solubilização dos materiais com "Tween 80®". Os resultados mostraram leve tendência dos fibroblastos serem menos sensíveis ao efeito tóxico que as células HeLa. O efeito inibitório do crescimento cessou quando as soluções teste foram diluídas a uma concentração abaixo da concentração inibitória mínima. A concentração da pasta de hidróxido de cálcio que inibiu completamente o crescimento de células HeLa e fibroblastos foi de 6,4%. Quando esse material foi testado em culturas na forma de mistura fluida filtrada, a concentração inibitória total foi de 0,1%. A filtração da mistura teste com remoção de partículas maiores que 1 μ de diâmetro, tornou o material menos tóxico e reduziu seu efeito inibitório sobre o crescimento de células conforme relato de Spångberg (1969d), exceto para o "N2" e "Riebler". Isso sugere que a toxicidade da maioria dos materiais obturadores de canal radicular reside em agentes tóxicos unidos às substâncias não solúveis em água.

Com o intuito de avaliar o efeito tóxico de materiais restauradores, cimentos dentários e outros materiais terapêuticos, Tronstad & Wennberg (1980) desenvolveram um método *in vitro* que permitiu a quantificação macroscópica da resposta celular. Com esse método, filtros tipo "Millipore" foram colocados sobre o fundo de placas de cultura e uma monocamada celular foi estabelecida sobre esses filtros. Ao final do

período de incubação, o meio de cultura foi substituído por um meio contendo 1,5% de Bacto-ágar e deixado solidificar. Depois o filtro e o revestimento com ágar foram destacados gentilmente do disco, girados de cabeça para baixo e recolocados na placa de cultura. Dessa forma, a monocamada celular repousa sobre o ágar com o filtro por cima. Os materiais a serem testados foram inseridos em lamínulas de vidro, com diâmetro de 7mm, colocados sobre o filtro e a placa é incubada por 2 horas. Então, os espécimes foram removidos e o filtro com as células aderidas gentilmente soltos da camada de ágar. As células aderidas ao filtro foram incubadas para demonstração citoquímica da atividade da succinato desidrogenase para avaliar um possível dano celular. Se um material tivesse efeito sobre as células, uma diminuição na coloração das células na área de contato material-célula representaria uma diminuição da atividade enzimática e, uma zona não corada na área de contato do filtro indicaria uma completa inibição da atividade enzimática. Dentre os materiais terapêuticos foi testado o óxido de zinco e eugenol e uma pasta de hidróxido de cálcio em solução salina isotônica em consistência cremosa. Os materiais foram testados após o preparo imediato e após períodos de 5, 15 e 60 minutos e 24 horas. Foi atribuído um índice com escores de 0 a 3 para graduar a resposta celular. O escore 0 indicou nenhuma influência sobre as células; escore 1 denotou reduzida coloração na área de contato material-célula; escore 2 significou zona não corada com diâmetro menor que 12mm; e, escore 3 representou zona não corada com diâmetro maior ou igual a 12mm. Os resultados mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio em solução salina produziu

escores 2 e 3 em todos os períodos, indicando um efeito tóxico forte e duradouro. Os autores concluíram que esses resultados pareceram dar uma boa indicação quanto à natureza desse material. A pasta de hidróxido de cálcio em solução salina tem um pH de 12,5 e efeito necrotizante em contato com o tecido pulpar quando usado como agente capeador, portanto, deveria ser esperado que apresentasse um efeito tóxico *in vitro*.

Utilizando cultivo celular obtido a partir de polpas dentárias humanas Das (1981) testou diversos materiais, dentre eles, pó de hidróxido de cálcio acondicionado em tubos estéreis de vidro. Foi usada a câmara de Rose com os materiais-teste pela facilidade de manter o material em posição, bem como de realizar fotografias, por um período de 48 horas. Observou-se uma zona avermelhada ao redor do tubo com hidróxido de cálcio. Nas primeiras horas as células nessa área permaneceram esféricas, enquanto o resto da câmara mostrou células aderidas. Após 24 horas, a zona avermelhada desapareceu e as células na área apresentaram aspecto e crescimento normal. O autor concluiu que a compatibilidade do hidróxido de cálcio em cultura de fibroblastos pulpares ocorreu, uma vez que as células cresceram abundantemente ao redor do capilar contendo tal substância. Além disso, o pH inicialmente alcalino pareceu não ter qualquer efeito nocivo sobre a proliferação celular.

Hanks et al. (1983) avaliaram o efeito, *in vitro*, de quatro medicamentos contendo hidróxido de cálcio, utilizados para capeamento pulpar, para saber se exerceriam algum efeito sobre a síntese proteica e de DNA e, também determinar se os componentes do soro desempenhariam

algum papel na estimulação da síntese proteica por estes materiais. Foram utilizadas subculturas de fibroblastos pulpaes humanos e de macacos. Os seguintes materiais foram testados: "New Improved Dycal[®]", "Hydrex[®]", "Life[®]" e "Calasept[®]". Enquanto a síntese proteica, bem como a síntese de DNA foram deprimidas pelo "Dycal[®]", "Hydrex[®]" e "Calasept[®]", a taxa da síntese proteica em cultura de células humanas, na presença do "Life[®]" aumentou atingindo os níveis do controle, quando o meio foi trocado diariamente, mas foi deprimida quando o meio não era trocado. Isso sugere que as proteínas séricas desempenham um papel protetor para os tecidos pulpaes sob condições inflamatórias, pelo menos no caso do "Life[®]", permitindo aos odontoblastos se diferenciarem e produzirem matriz dentinária sem interferência dos componentes tóxicos ou da alcalinidade excessiva.

A fim de avaliar o efeito do hidróxido de cálcio sobre a divisão celular pela mensuração da síntese de DNA dos fibroblastos pulpaes em cultura de células, Torneck et al. (1983) realizaram um estudo. Devido à baixa solubilidade em água, 0,0121g de hidróxido de cálcio foi dissolvido em 10ml de água destilada a 23°C. O sobrenadante foi filtrado estéril e a concentração de íons cálcio foi de 0,1137g/ml. A solução foi misturada com o meio de cultura para tentar estabelecer contato uniforme com todas as células na placa de cultura e assegurar que o volume da solução usado não alteraria o pH do meio de forma a afetar adversamente o crescimento celular. O efeito da solução de hidróxido de cálcio (0,001137g/ml) sobre a síntese de DNA de fibroblastos pulpaes de porco foi avaliada medindo-se a incorporação de timidina triciada. Os resultados indicaram que a adição de

0,025ml de solução aquosa de hidróxido de cálcio ao meio de cultura levou a uma maior incorporação do marcador radioativo pelos fibroblastos pulpares. Esse efeito não foi tão evidente quando 0,050ml de solução de hidróxido de cálcio foi usado. Parece, portanto, que a presença de certas concentrações de hidróxido de cálcio são mitogênicas para os fibroblastos pulpares, enquanto outras não são.

Zmener & Cabrini (1987) analisaram os efeitos adversos de três materiais à base de hidróxido de cálcio sobre o comportamento de uma população celular mista de monócitos sanguíneos e linfócitos. As células foram mantidas ou em contato direto ou próximo às amostras teste de "Sealapex", "CRCS" e "Dycal". Os efeitos adversos destes materiais aumentaram nessa ordem e as diferenças observadas entre cada material e seu respectivo controle, bem como entre os próprios materiais foram estatisticamente significantes. Segundo o autor, estes resultados poderiam ser atribuídos a possíveis diferenças na capacidade dos íons cálcio e hidroxila saírem das amostras de cada material, produzindo diferentes níveis de alcalinidade no meio de cultura, tornando-o um meio adverso para as células cultivadas. O "Dycal" pode produzir um forte meio alcalino. Além disso, pode ser que outros componentes do material endurecido e não o hidróxido de cálcio possam exibir algum grau de toxicidade. Por sua vez, o "CRCS" contém eugenol e eucaliptol, o que poderia explicar os fortes efeitos adversos do "CRCS" quando comparado ao "Sealapex". De acordo com os resultados desse trabalho, parece que os graus de inibição de adesão celular correlacionaram-se com a toxicidade. Como as células foram mantidas em

contato com os materiais por apenas 1 hora, os autores sugeriram que fossem realizados estudos mais extensos para esclarecer o comportamento celular ao contato com materiais à base de hidróxido de cálcio.

Quando o hidróxido de cálcio ou a hidroxiapatita são usados como agente capeador pulpar, *in vivo*, observa-se uma ponte de dentina reparativa. No entanto, enquanto novo tecido é formado diretamente sob a hidroxiapatita, abaixo do hidróxido de cálcio aparece uma área necrótica. As diferentes reações pulpares a esses dois agentes capeadores desencadeiam diferentes respostas celulares. Baseados nesse ponto de vista, Alliot-Licht et al. (1994) realizaram estudo, com o objetivo de analisar, *in vitro*, o comportamento de fibroblastos pulpares humanos em contato com pó de hidroxiapatita pura e comparar com os efeitos do hidróxido de cálcio. Após isolamento e seleção dos fibroblastos pulpares humanos, *in vitro*, as células foram caracterizadas quanto a sua morfologia, sua alta atividade específica da fosfatase alcalina e a síntese de fibronectina e colágenos tipo I e III. A fim de evitar a interferência com a adesão celular e difusão, o hidróxido de cálcio ou hidroxiapatita foi colocado sobre fibroblastos pulpares humanos aderidos, os quais foram semeados 4 horas antes. As células foram incubadas na presença ou de hidroxiapatita (1,0 mg/ml) ou de hidróxido de cálcio (0,8 mg/ml). Com o hidróxido de cálcio as células exibiram alterações dramáticas na morfologia, síntese de DNA, atividade da fosfatase alcalina e síntese de proteína, concordando com a necrose observada *in vivo*. Com a hidroxiapatita observou-se atividade fagocitária dos fibroblastos pulpares em direção às partículas de hidroxiapatita (<10 μm). Como consequência da

fagocitose, a síntese de DNA foi afetada. Esse efeito inibitório do crescimento celular pela hidroxiapatita não foi devido ao dano celular, como demonstrado pelo aumento na incorporação de prolina e lisina triciadas pelas células indicando estimulação da atividade metabólica. A atividade da fosfatase alcalina é um pré-requisito para a diferenciação celular. A hidroxiapatita produziu um efeito inibitório sobre a atividade da fosfatase alcalina, sugerindo que os fibroblastos pulparem não estavam em estado de diferenciação. Concluindo, comparado aos efeitos do hidróxido de cálcio sobre fibroblastos pulparem humanos, estes dados são consistentes com a biocompatibilidade da hidroxiapatita, descrita previamente *in vivo* e comprova a ocorrência da resposta biológica produzida por este biomaterial sintético.

Sabendo que a adesão e o crescimento celular, além da capacidade de divisão celular (viabilidade celular) são funções de vital importância ao reparo de feridas, Lencheden (1994) estudou o comportamento de fibroblastos, *in vitro*, em diferentes concentrações de cálcio e níveis de pH. Fibroblastos embrionários de pulmão humano (fibroblastos HEDL) e fibroblastos do ligamento periodontal (fibroblastos PDL) foram cultivados em meio de cultura em níveis de pH fixos variando de 7.2 e 8.4, e concentrações fixas de cálcio variando entre $\leq 100 \mu\text{M}$ e 20 mM, na tentativa de simular os efeitos do hidróxido de cálcio sobre as funções celulares vitais, tais como adesão e crescimento. Fibroblastos PDL pareceram ser mais susceptíveis a alterações no pH e concentração de cálcio do que os fibroblastos HEDL. Em níveis de pH acima de 7.8, tanto a adesão como o crescimento diminuíram significativamente. As alterações na

concentração de cálcio e no pH influenciaram mais o crescimento do que a adesão celular.

Referente à avaliação da toxicidade de pastas à base de iodofórmio *in vitro*, observa-se na literatura que são escassos os trabalhos realizados.

Com o intuito de determinar a reação tecidual, a toxicidade celular, as propriedades bactericidas e a tolerância tecidual a dez cimentos de canal radicular comumente usados, Rappaport et al. (1964) realizaram um trabalho. Para o estudo da toxicidade celular foram cultivadas células HeLa em meio de Eagle. Os materiais foram colocados sobre as células em diferentes concentrações e as culturas foram examinadas, ao microscópio, após 5 minutos, 1 hora, 12, 24, 48, 72 e 96 horas para evidenciar degeneração tóxica. Os materiais foram classificados partindo do mais para o menos tóxico. Para todos os cimentos a concentração de 2% foi tóxica. Nenhum composto foi tóxico quando diluído além de 0,2%. Para o cimento "Mynol", que contém iodofórmio na sua composição, além de óxido de zinco, subnitrato de bismuto e resina, veiculados em eugenol, creosoto e timol, a toxicidade diminuiu dentro da variação média dos materiais testados. Na diluição a 0,5% houve perda da toxicidade, sendo tóxico nas concentrações de 1 e 2%.

Bae et al. (1987) realizaram estudo sobre a toxicidade do iodofórmio utilizando cultura de fibroblastos V79, originadas de hamster chinês, com a finalidade de verificar se havia inibição da proliferação celular, morfologia, índice de sobrevivência e inibição da síntese de DNA e RNA. O

iodofórmio em pó foi dissolvido em di-metil-sulfóxido (DMSO) na concentração de 60mg de iodofórmio/ml. Essa solução foi diluída em meio essencial mínimo de Eagle. Os resultados mostraram que o crescimento das células foi levemente reduzido pelo tratamento com o iodofórmio a 30 $\mu\text{g/ml}$ por 24 e 48 horas. Nenhum efeito inibitório na sobrevivência celular foi observado em culturas tratadas com 10 a 30 $\mu\text{g/ml}$ por 2 a 24 horas. No entanto, o tratamento com iodofórmio a 100 $\mu\text{g/ml}$ por 2, 6, 12 ou 24 horas produziu uma sobrevivência celular de $86,9 \pm 13,3\%$, $32,2 \pm 8,0\%$, $4,5 \pm 2,5\%$ ou 0% de culturas não tratadas, respectivamente. A exposição das células em 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ por 2 horas resultou em inibição da síntese proteica e de DNA e RNA.

Com a finalidade de comparar os efeitos antimicrobiano e citotóxico da pasta "Kri 1", um material obturador de dentes decíduos à base de iodofórmio, com o óxido de zinco e eugenol (OZE), Wright et al. (1994) realizaram estudo utilizando técnicas *in vitro*. A avaliação antimicrobiana foi feita através da medida das zonas de inibição do *Streptococcus faecalis* em meio de ágar-sangue. Por sua vez, a avaliação da citotoxicidade envolveu experimentos de contato direto do medicamento com a célula por 4 e 24h, usando medicamentos recém-preparados e após tomar presa e, também, experimentos de contato indireto medicamento-célula com 24 horas de duração, usando medicamentos frescos e após tomar presa. Os resultados mostraram que o óxido de zinco produziu maior zona de inibição bacteriana que a pasta "Kri 1", contrastando com outros estudos, talvez devido à quantidade aumentada de eugenol incorporado ao óxido de zinco para se

aproximar da consistência da pasta "Kri 1". Nos experimentos do contato indireto, a citotoxicidade do OZE diminuiu a níveis do controle após apenas 1 dia do endurecimento, enquanto foi maior para a pasta "Kri 1". Os resultados sugeriram que o OZE tem menor citotoxicidade, embora o contato prolongado, medicamento-célula possa resultar em ambos medicamentos apresentarem alta citotoxicidade. Quando colocada em contato direto com as células a pasta "Kri 1" foi, no mínimo, tão citotóxica quanto o óxido de zinco e eugenol e, ao contato indireto, a pasta "Kri 1" foi mais tóxica que o óxido de zinco e eugenol.

Preocupados em avaliar o efeito de uma pasta composta de iodofórmio e carbowax, Daniel et al. (1996) realizaram estudo empregando cultura de células. Para tal estudo foram utilizados fibroblastos 3T3 NIH/SWISS. Três dias após o plaqueamento, culturas confluentes receberam lamínulas de vidro pinceladas com 0,02g da pasta. Após 0, 6, 12 e 24 horas do contato inicial com a pasta, as células controle e tratadas foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, fornecendo dados para a curva de viabilidade celular. Os resultados mostraram que não houve alteração do número de células e viabilidade celular até 12 horas. Após esse período, a viabilidade das células tratadas diminuiu drasticamente e, em 24 horas, praticamente todas as células morreram. Concluiu-se que até 12 horas o iodofórmio mostrou-se biocompatível, no entanto, após ser metabolizado, provavelmente ocorreu a liberação de algum componente tóxico para as células, matando-as em 24 horas.

Com a finalidade de avaliar o efeito citotóxico da pasta de Guedes-Pinto, a qual contém iodofórmio na sua composição, Santos et al. (1996) utilizaram ensaios de viabilidade pela exclusão de células coradas pelo azul de trypan. Para realização do estudo, fibroblastos NIH 3T3 SWISS foram plaqueados na densidade de 2×10^4 por placa de Petri de 60mm de diâmetro. Dois dias após o plaqueamento, culturas confluentes receberam lamínulas de vidro contendo 0,06g da pasta Guedes-Pinto. Como controle negativo foram testadas lamínulas de vidro sem medicamento. Após 0, 4, 8 e 12 horas do contato com a pasta, as células foram contadas em câmaras de Neubauer, fornecendo dados para a viabilidade celular. Também foi executada a mesma metodologia em fibroblastos de polpa obtidos de cultura primária de polpa. Os resultados indicaram que a viabilidade celular ocorreu até 12 horas após o contato com a pasta e, após esse período, observou-se morte celular, o que sugere ser por alguma substância liberada.

Estabelecida a importância do cultivo celular como metodologia de pesquisa científica, bem como a necessidade de ser realizada uma avaliação da reação celular ao contato com materiais dentários, nos propusemos a realizar um estudo *in vitro*, com a finalidade de avaliarmos a ação do iodofórmio e do hidróxido de cálcio quando associado a dois veículos diferentes, sobre cultura de fibroblastos 3T3 (NIH/SWISS), oriundos de embriões de camundongos.

3. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, nos propusemos a realizar uma avaliação comparativa da citotoxicidade do iodofórmio e do hidróxido de cálcio, associados a dois veículos diferentes: o polietileno glicol 400 na forma pura (líquido) e o carbowax (creme), bem como dos veículos isoladamente, utilizando-se ensaios de viabilidade pela exclusão de células coradas pelo azul de Trypan. O objetivo do estudo foi comparar tanto a ação imediata quanto a ação tardia dessas drogas sobre fibroblastos NIH 3T3 Swiss.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem celular NIH-3T3 Swiss, fibroblastos originados de embriões de camundongos, linhagem celular contínua de células com alta inibição de contato (ATCC CRL 1658). Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar.

4.1 - *Material:*

- ✿ Capela de fluxo laminar (VECO - Campinas, SP, Brasil)
- ✿ Tubo criogênico (Sigma)
- ✿ Banho-maria a 37°C (Fanem, SP)
- ✿ Di-metil-sulfóxido - DMSO(Sigma)
- ✿ Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM) (Sigma)
- ✿ Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (Fanem, SP)
- ✿ Frasco plástico de cultivo celular - 25 cm² (Costar)
- ✿ Soro fetal bovino (Sigma)
- ✿ Solução antibiótica/antimicótica (Sigma)

- ✿ Incubadora com controle de temperatura/pressão (Forma Scientific)
- ✿ Microscópio invertido de fase (Axiovert 25 - ZEISS)
- ✿ Pipetas de vidro graduadas (Costar)
- ✿ Pipetas Pasteur (Costar)
- ✿ Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) (Sigma)
- ✿ Solução de tripsina 0,25% (Sigma)
- ✿ Tubo de ensaio (Costar)
- ✿ Azul de Trypan a 0,4% (Sigma)
- ✿ Câmara de Neubauer (Baxter)
- ✿ Placas de Petri (60 mm de diâmetro) (Costar)
- ✿ Lamínulas de vidro (15 mm de diâmetro) (Costar)
- ✿ Iodofórmio (Botica ao Vead'ouro Ltda., São Paulo)
- ✿ Hidróxido de cálcio P.A.(Pró-análise) (Botica ao Vead'ouro Ltda., São Paulo)
- ✿ Polietileno glicol 400 (PEG 400) (Botica ao Vead'ouro Ltda., São Paulo)
- ✿ Carbowax (36ml de PEG 400 + 31,5g de PEG 4000) (Botica ao Vead'ouro Ltda., São Paulo)
- ✿ Balança analítica de precisão (OHAUS)
- ✿ Placa de vidro para manipulação de cimentos dentários
- ✿ Espátula para manipulação de cimentos dentários

4.2 - Métodos:

4.2.1 - Cultivo celular e determinação do número de células existentes no frasco original

Um tubo criogênico contendo as células congeladas foi descongelado rapidamente (60 segundos) em banho de água a 37°C. Para remover a substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido - DMSO), o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10ml de meio de cultura e centrifugado a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células, resultante da centrifugação, foi ressuspensionado em 1,0ml de meio de cultura fresco e então, transferido para um frasco plástico de cultivo celular de 25cm² de área cultivável, contendo 5ml de meio de cultura fresco. O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

As células foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando a monocamada celular tornou-se subconfluenta. Para tal, o meio do frasco foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com uma solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7.2. A seguir, as células foram separadas com 2,0ml de uma solução de tripsina 0,25%, durante 1 minuto, a 37°C. A tripsina foi então

inativada com 5,0ml de meio de cultura contendo soro fetal bovino e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1,0ml de DMEM fresco. Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento que deu origem a novas passagens da cultura. Para a determinação do número de células existentes no frasco original os precipitados foram ressuspensionados em 1,0ml de PBSA e, 0,1ml dessa suspensão celular foi dispensado em um tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8ml de PBSA e 0,1ml de azul de Trypan a 0,4%, um corante para células não vitais. Posteriormente, algumas gotas dessa mistura foram transferidas para um hemocitômetro ou câmara de Neubauer (Figura 1) que, a seguir, foi levado ao microscópio invertido de fase para a realização da contagem do número de células. As células coradas em azul representam as células mortas, enquanto as células não coradas são as células viáveis (Figura 2).

Então, a suspensão celular restante (0,9ml) foi centrifugada. Novamente, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1,0ml de meio de cultura (DMEM) fresco. Dependendo do número de células existentes no frasco original foi adicionado a essa suspensão uma determinada quantidade de DMEM, de modo que obtivéssemos 1×10^4 células em cada 0,1ml. Tal suspensão de células foi então novamente cultivada em placas de Petri de 60mm de diâmetro, onde as células aderiram e cresceram. Para a

manutenção da viabilidade das células a troca dos meios de cultivo dos frascos e das placas de Petri foi feita a cada dois ou três dias.

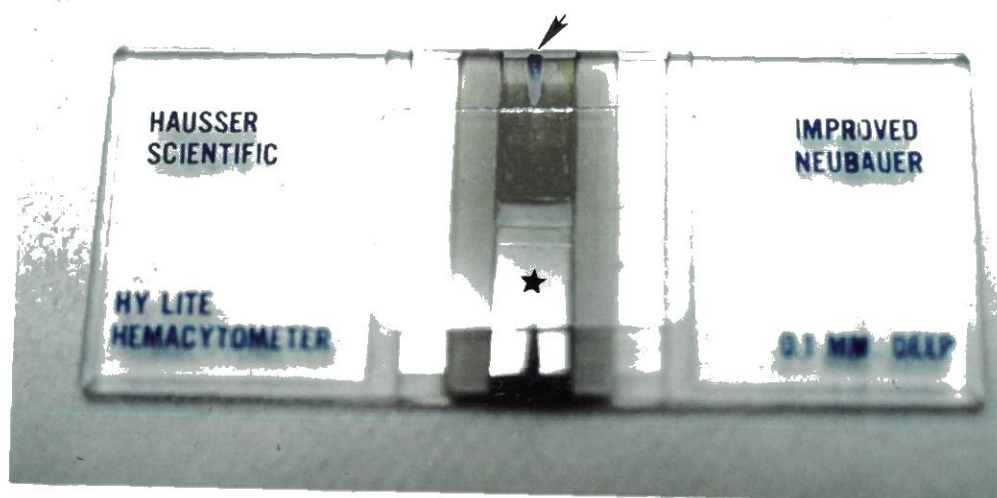


Figura 1 - Fotografia do hemocitômetro ou câmara de Neubauer utilizada para contagem do número de células viáveis e mortas. Detalhe de uma das câmaras (★) onde é gotejada a suspensão celular (seta)

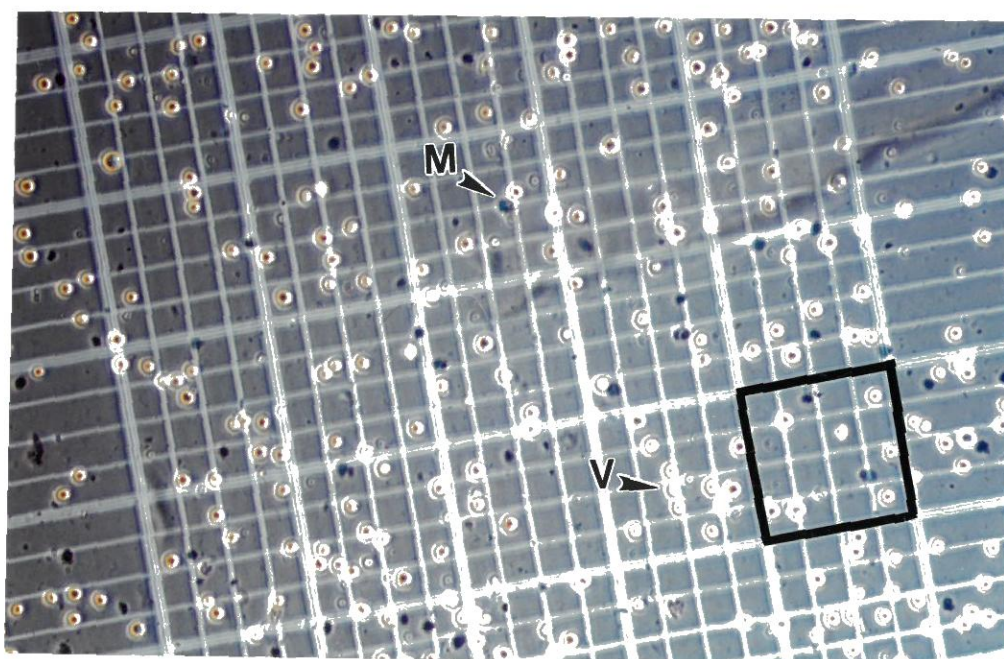


Figura 2 - Fotografia do hemocitômetro visto ao microscópio invertido de fase. Detalhe de uma célula morta (M) corada em azul e de uma célula viável (V) não corada. Cada câmara contém 25 quadrados (□). Dentro de cada quadrado contamos e registramos o número de células vivas e mortas, para posterior realização das curvas de crescimento e de viabilidade celular (x100)

4.2.2 - Grupos experimentais:

Resposta celular imediata ou de curto prazo

Grupo I - Controle(lamínula de vidro sem substância)

Grupo II - Carbowax

Grupo III - Polietileno glicol 400 (PEG 400)

Grupo IV - Iodofórmio + Carbowax

Grupo V - Iodofórmio + Polietileno glicol 400

Grupo VI - Hidróxido de cálcio P.A.(Pró-análise) + Carbowax

Grupo VII - Hidróxido de cálcio P.A. + Polietileno glicol 400

Sobrevivência celular a longo prazo

Grupo I - Controle I (sem lamínula de vidro e sem substância)

Grupo II - Controle II (lamínula de vidro sem substância)

Grupo III - Carbowax

Grupo IV - Polietileno glicol 400

Grupo V - Iodofórmio + Carbowax

Grupo VI - Iodofórmio + Polietileno glicol 400

Grupo VII - Hidróxido de cálcio P.A.(Pró-análise) + Carbowax

Grupo VIII - Hidróxido de cálcio P.A. + Polietileno glicol 400

4.2.3 - *Preparo das substâncias:*

As substâncias sob a forma de pó e creme foram pesadas em balança analítica de precisão, enquanto o veículo foi mensurado utilizando-se uma pipeta de vidro estéril com capacidade de 1,0ml. A seguir as pastas foram manipuladas em uma placa de vidro estéril de acordo com as seguintes proporções relacionadas a seguir:

Iodofórmio + Polietileno glicol 400

- Iodofórmio 0,25 g
- Polietileno glicol 400 0,1 ml

Iodofórmio + Carbowax

- Iodofórmio 0,25 g
- Carbowax 0,50 g

Hidróxido de cálcio + Polietileno glicol 400

- Hidróxido de cálcio 0,25 g
- Polietileno glicol 400 0,2 ml

Hidróxido de cálcio + carbowax

- Hidróxido de cálcio 0,25 g
- Carbowax 0,50 g

4.2.4 - Resposta celular imediata ou de curto prazo

Para realização desta fase do experimento, as células crescidas nos frascos foram tripsinizadas e contadas para determinação do número de células existente no frasco original, conforme anteriormente descrito. A suspensão celular restante foi novamente centrifugada e resuspendida em 1,0ml de meio novo e plaqueadas numa densidade de 2×10^4 células em placas de Petri de 60mm de diâmetro, contendo 5,0ml de meio de cultura. Após o período de 72 horas, culturas confluentes receberam lamínulas de vidro de 15mm contendo 0,02g da substância a ser testada (Figura 3) e as culturas controles receberam lamínulas de vidro sem material. A face da lamínula contendo a substância foi colocada em contato direto com as células. Então, 0, 6, 12 e 24 horas após o contato com as substâncias, as células de 3 placas de Petri, para cada período experimental, foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer, utilizando-se o microscópio invertido de fase, perfazendo um total de 12 placas de Petri por substância testada.

Ao final de 24 horas do experimento foram realizadas curvas de porcentagem de viabilidade celular em função do tempo experimental, que foram comparadas por meio de análise estatística.

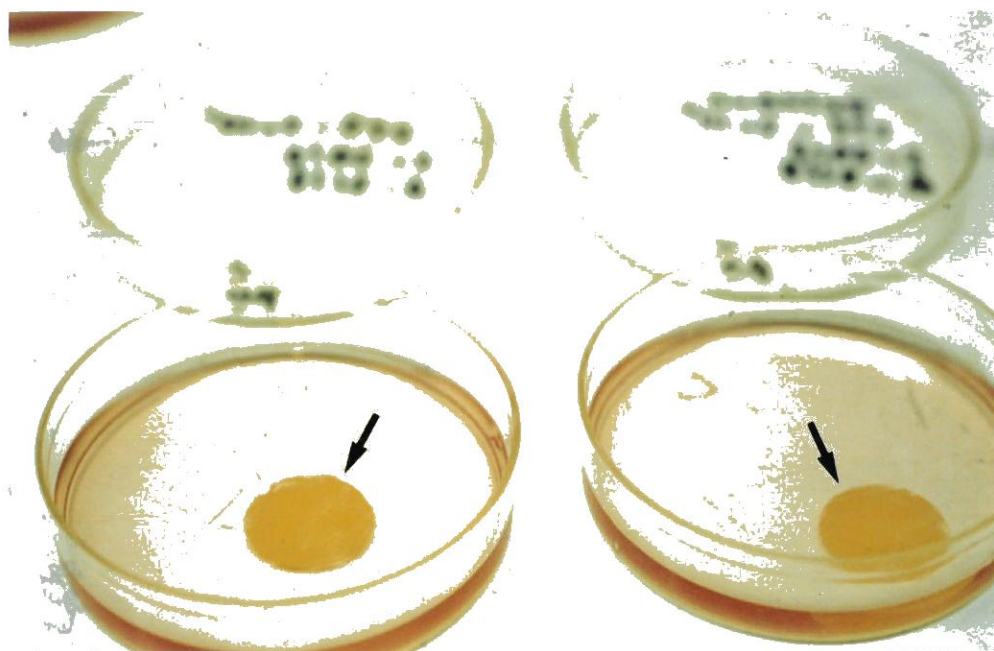


Figura 3 - Fotografia de placas de Petri onde fibroblastos foram cultivados em meio de cultura (DMEM). Detalhe de lamínulas de vidro contendo a substância testada (setas)

4.2.5 - Sobrevivência celular a longo prazo

Para o desenvolvimento desta etapa do estudo, fibroblastos NIH-3T3 Swiss, originados dos frascos, foram plaqueados em número de 1×10^4 células por placa de Petri de 60mm de diâmetro. Então, 4 horas após o plaqueamento, lamínulas de vidro de 15mm de diâmetro, contendo 0,02g da substância a ser testada, foram colocadas sobre as células, enquanto as culturas controles receberam somente lamínulas de vidro. Após 1, 3, 5 e 7 dias do contato com as substâncias, as células foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer, utilizando-se o microscópio invertido de fase, perfazendo um total de 3 placas de Petri por período experimental (Freshney, 1990).

Ao final dos 7 dias do experimento foram realizadas curvas de crescimento e de porcentagem de viabilidade celular em função do tempo, as quais foram comparadas através de método estatístico.

4.2.6 - Contagem celular dos experimentos

Para a separação das células, as placas de cultura foram submetidas à tripsinização, individualmente, e as células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos com uma pressão de 300g. O precipitado de células foi ressuspensão em 1,0ml de PBSA. Uma alíquota de 0,1ml dessa suspensão de células foi dispensada em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 0,8ml de PBSA e 0,1ml de azul de Trypan a 0,4%. Ambas as câmaras de um hemocítômetro (Figura 1) receberam algumas gotas dessa suspensão celular, as quais foram contadas sob microscópio invertido de fase. O número de células vivas e o número de células mortas foi registrado (Figura 2) para posterior utilização nas equações matemáticas descritas a seguir.

O número total de células originárias das placas de Petri foi obtido através da seguinte eq. (1):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas} \times \text{Diluição} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados usados para contagem}} \quad (1)$$

Somente as células mortas apareceram coradas em azul. A exclusão dessas células da contagem geral serviu para a determinação do número de células viáveis e da porcentagem de viabilidade celular.

O número total de células viáveis foi obtido através da mesma eq. (2) somente excluindo as células mortas:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células viáveis} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células contadas (não coradas)} \times \text{Diluição} \times 10^4}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrados usados para contagem}} \quad (2)$$

O percentual de viabilidade da população celular foi obtido pela Form. (1) a seguir (Freshney, 1990):

$$\frac{\text{Número total de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.7 - Análise estatística

Os pontos das curvas de crescimento e de viabilidade celular representam a média $\pm$ o erro da média da contagem de 3 placas de Petri, para cada período experimental. Os dados obtidos foram comparados através de teste estatístico de análise de variância e complementado pelo teste de Tukey para comparação entre médias (GMC Basic Software, versão 7.1). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Para uma melhor compreensão, os resultados foram divididos em 3 partes: (A) Resposta celular imediata ou de curto prazo - nesta fase foi possível avaliar a reação dos fibroblastos ao contato com as substâncias, nos períodos experimentais de 0, 6, 12 e 24 horas, a qual foi representada graficamente por curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem de viabilidade em função do tempo; (B) Sobrevivência celular a longo prazo - nesta etapa, foram realizadas curvas de crescimento que representam, graficamente, o número absoluto de células viáveis, nos períodos experimentais de 1, 3, 5 e 7 dias; (C) Sobrevivência celular a longo prazo - finalmente, foram realizadas curvas de viabilidade celular, as quais representam, graficamente, a porcentagem de viabilidade, nos períodos experimentais de 1, 3, 5 e 7 dias.

Os dados originais obtidos para os experimentos da parte A (Tabela A do apêndice) forneceram uma homogeneidade da amostra e, portanto, uma curva de distribuição normal (Anexo A-1), permitindo a realização do teste estatístico paramétrico de análise de variância (Anexo A-1) e teste de Tukey (Anexos A-1 e A-2) para verificar a significância das

variáveis em estudo. A comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular, para o fator de variação: interação (tempo x medicação), segundo a mesma medicação, nos diferentes tempos experimentais encontra-se no Anexo A-3.

Os dados originais obtidos com os experimentos da parte B (Tabela B do Apêndice) forneceram uma curva de distribuição não normal (Anexo B-1), razão pela qual foi realizada uma transformação dos dados para logaritmos dos dados + 1 ($\log \text{ dados} + 1$) (Anexo B-1), a fim de se obter uma homogeneidade da amostra e curva com distribuição normal e, portanto, um resultado da análise estatística mais preciso, ao verificarmos a significância das variáveis em estudo. Os dados transformados encontram-se na Tabela D do apêndice. Neste caso também foi aplicado o teste estatístico de análise de variância (Anexo B-1), complementado pelo teste de Tukey (Anexo B-2). A comparação das diferenças entre as médias dos valores transformados dos números de células viáveis, para o fator de variação: interação (tempo x medicação), segundo a mesma medicação, nos diferentes tempos experimentais encontra-se no Anexo B-3.

Os dados originais obtidos para os experimentos da parte C (Tabela C do Apêndice) forneceram uma curva de distribuição normal (Anexo C-1), razão pela qual foi realizado um teste estatístico paramétrico de análise de variância (Anexo C-1) e teste de Tukey (Anexos C-1 a 2) para verificar a significância das variáveis em estudo. A comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular, para o

fator de variação: interação (tempo x medicação), segundo a mesma medicação, nos diferentes tempos experimentais encontra-se no Anexo C-3.

PARTE A - Resposta celular imediata ou de curto prazo

Os valores correspondentes à média e erro da média das porcentagens de viabilidade celular para o fator de variação: interação (tempo x medicação), segundo os tempos experimentais, estão descritos na Tabela 5.1. A partir destes dados foram construídos os gráficos das curvas de viabilidade celular (Figuras 4, 5, 12, 13 e 14).

TABELA 5.1 - Valores da média e erro da média correspondentes à porcentagem de viabilidade celular, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de curto prazo

Período Grupo	0 hora		6 horas		12 horas		24 horas	
	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média
GI	90,051	1,544	89,548	1,642	90,038	1,945	91,090	1,245
GII	90,370	3,460	90,699	0,711	89,092	0,772	81,099	6,616
GIII	90,284	1,421	88,727	0,394	87,209	0,366	86,186	3,763
GIV	91,898	0,739	88,590	0,857	88,159	0,516	39,599	1,630
GV	89,686	1,585	88,540	0,274	82,438	1,943	18,037	0,950
GVI	90,810	3,237	90,686	3,699	89,396	2,357	89,132	2,566
GVII	88,700	1,039	86,113	3,174	87,710	1,255	90,814	0,966

O gráfico da figura 4 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos controle (GI), carbowax (GII) e PEG 400 (GIII), nos diferentes tempos

experimentais. Analisando a Tabela 5.2, observa-se que não há diferença estatística significativa em nenhum tempo experimental entre esses grupos.

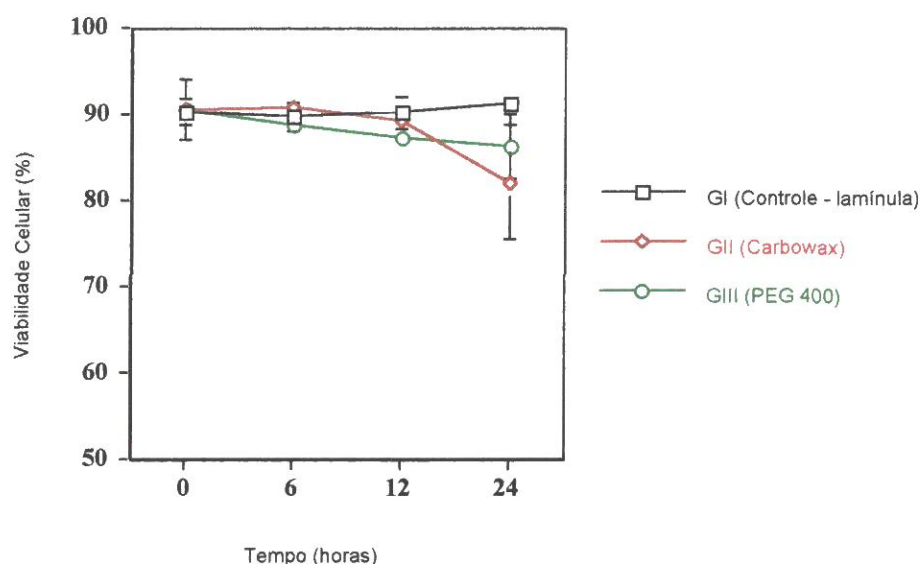


Figura 4 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII e GIII (resposta celular imediata ou de curto prazo)

Tabela 5.2 - Comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular, para o experimento de curto prazo, segundo os diferentes tempos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 12,60596.

Gráficos	Período Grupo	0 HORA		6 HORAS		12 HORAS		24 HORAS	
		Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$
Figura 4	GI x GII	0,319	ns	1,151	ns	0,946	ns	9,991	ns
	GI x GIII	0,233	ns	0,821	ns	2,828	ns	4,904	ns
	GII x GIII	0,086	ns	1,972	ns	1,883	ns	5,087	ns
Figura 5	GI x GIV	1,847	ns	0,958	ns	1,879	ns	51,491	s
	GI x GV	0,365	ns	1,008	ns	7,600	ns	73,053	s
	GIV x GV	2,212	ns	0,050	ns	5,721	ns	21,562	s
Figura 12	GI x GVI	0,759	ns	1,138	ns	0,642	ns	1,958	ns
	GI x GVII	1,351	ns	3,435	ns	2,328	ns	0,276	ns
	GVI x GVII	2,110	ns	4,572	ns	1,686	ns	1,682	ns
Figura 13	GIV x GVI	1,088	ns	2,096	ns	1,237	ns	49,533	s
Figura 14	GV x GVII	0,986	ns	2,427	ns	5,272	ns	72,777	s

ns - não significante

s - significante

O gráfico da Figura 5 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GI (controle), GIV (iodofórmio + carbowax) e GV (iodofórmio + PEG 400), expressa em porcentagem de viabilidade, nos diferentes tempos experimentais. Na Tabela 5.2 observa-se que não há diferença estatística significativa nos períodos de 0, 6 e 12 horas (Figuras 6, 7). No entanto, após 24 horas (Figuras 8 a 11) do contato das células com a medicação observa-se diferença estatística significativa entre os grupos: GI x GIV, GI x GV e GIV x GV.

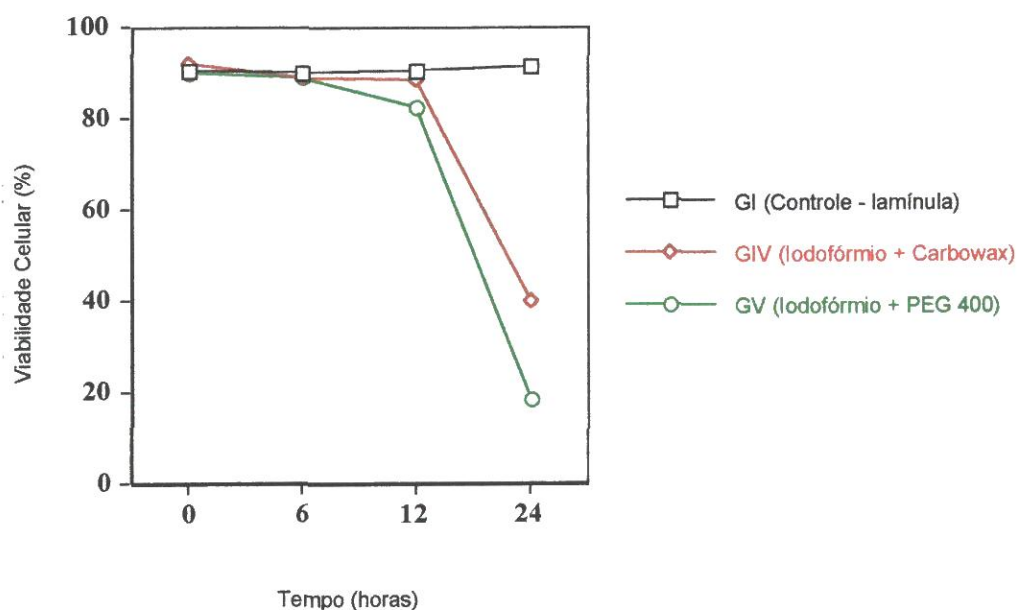


Figura 5 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GIV e GV (resposta celular imediata ou de curto prazo)

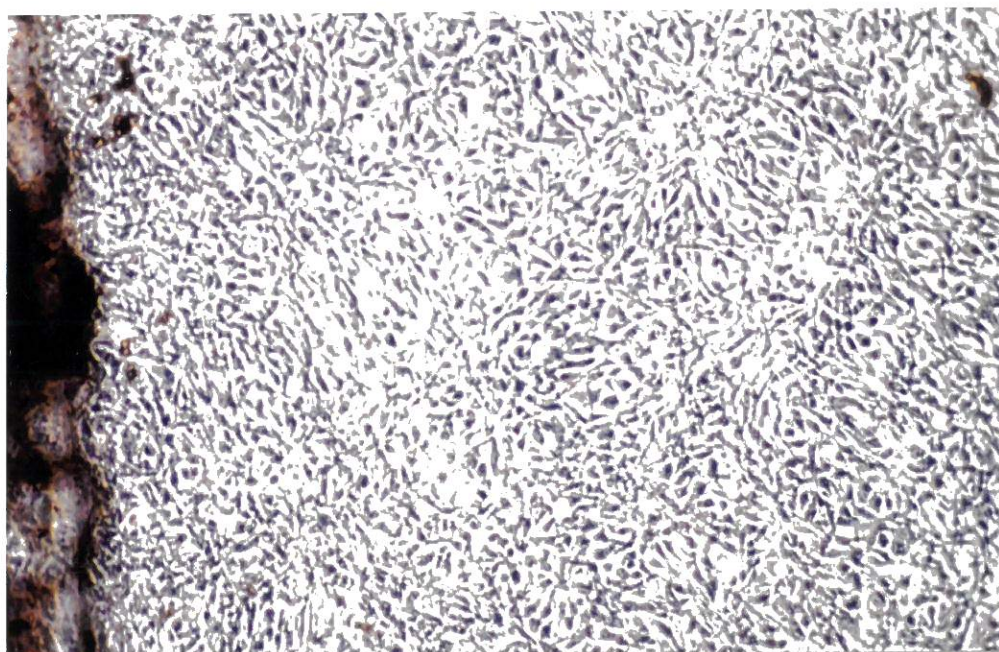


Figura 6 - Cultura de fibroblastos 3T3 confluenta (0 hora - Iodofórmio + PEG 400); células fusiformes e que, independentemente da droga ou veículo utilizado, apresentou o mesmo aspecto microscópico para todos os grupos (x100)

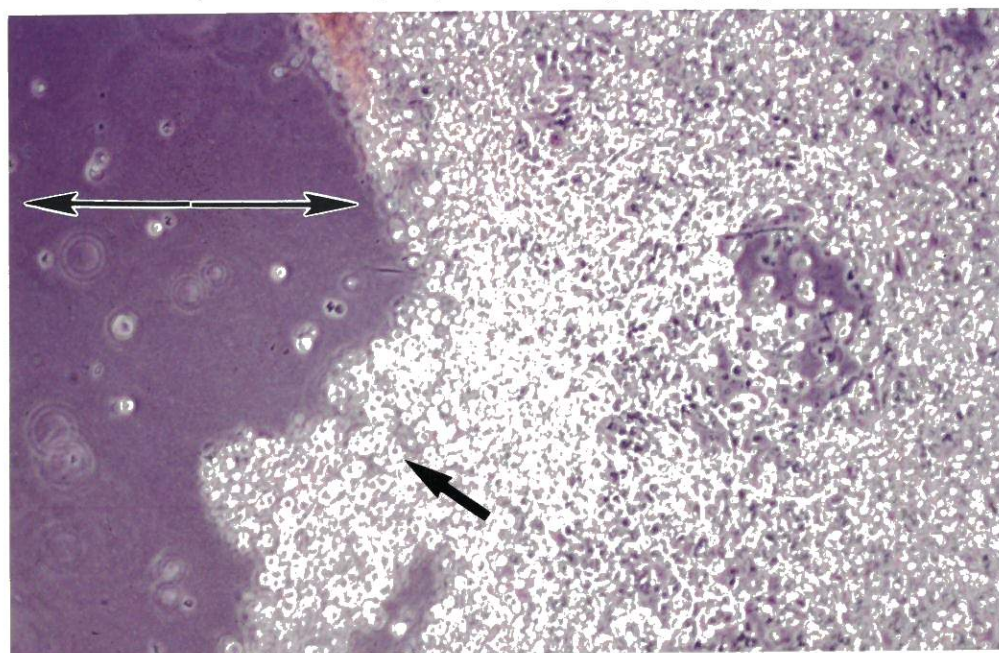


Figura 7 - Halo de inibição ($\longleftrightarrow$) próximo à substância e células mortas (seta) com aspecto arredondado, muitas se soltando do substrato. Esse aspecto foi observado após 12 horas nos grupos GIV (iodofórmio + carbowax), GV (iodofórmio + PEG 400), GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400) (x100)

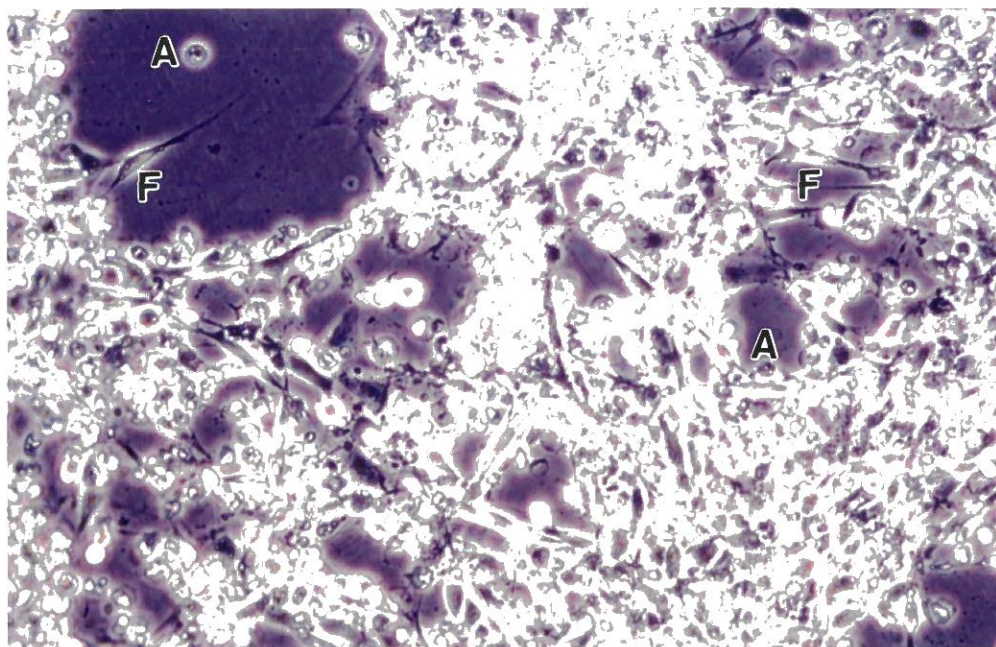


Figura 8 - Cultura em regiões mais afastadas da lamínula com a droga (24 horas). Podemos observar a permanência de algumas células de aspecto fusiforme (F) ainda aderidas ao substrato, de permeio a vários células arredondadas, mortas (A) que estão se soltando (grupo GIV - iodofórmio + carbowax) (x200)

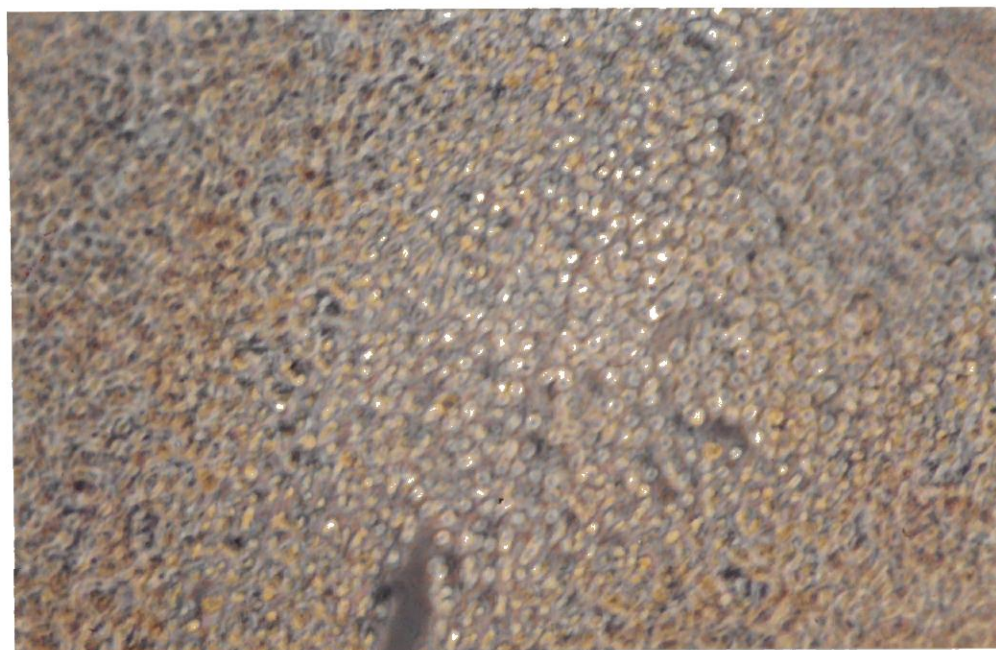


Figura 9 - Cultura em regiões mais afastadas da lamínula com a droga (24 horas). Todas as células arredondadas, a maioria solta do substrato, mortas (grupo GV - iodofórmio + PEG 400) (x200)

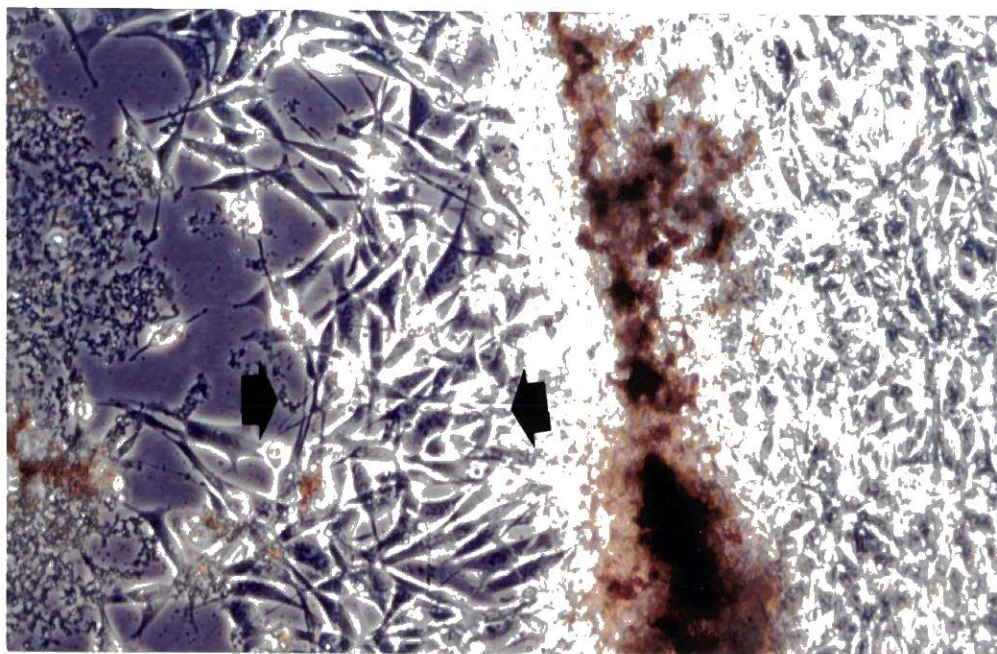


Figura 10 - Aspecto observado, após 24 horas, nos grupos GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400), mostrando a recuperação das células perdidas com o preenchimento do halo de inibição com células vitais de aspecto fusiforme (setas) (x200)

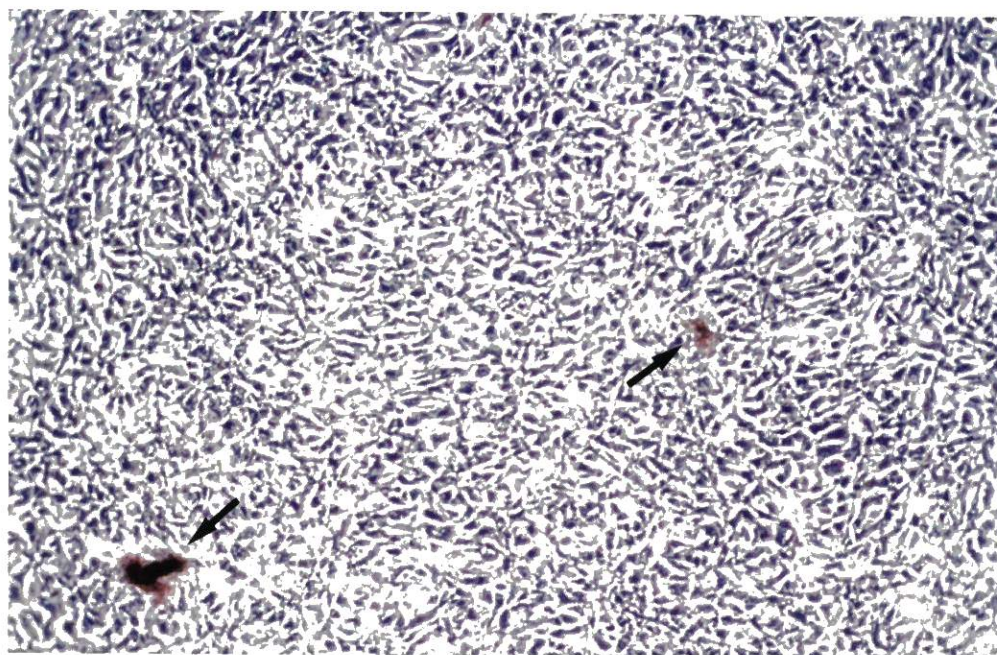


Figura 11 - Aspecto observado, após 24 horas, nos grupos GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400). À distância da lamínula, as células continuam de aspecto fusiforme e confluentes, mesmo perto de fragmentos da pasta (setas) (x100)

O gráfico da Figura 12 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GI (controle), GVI (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Observa-se que não há diferença estatística significativa em nenhum período experimental (Figuras 10 e 11), o que pode ser visto em detalhes na Tabela 5.2.

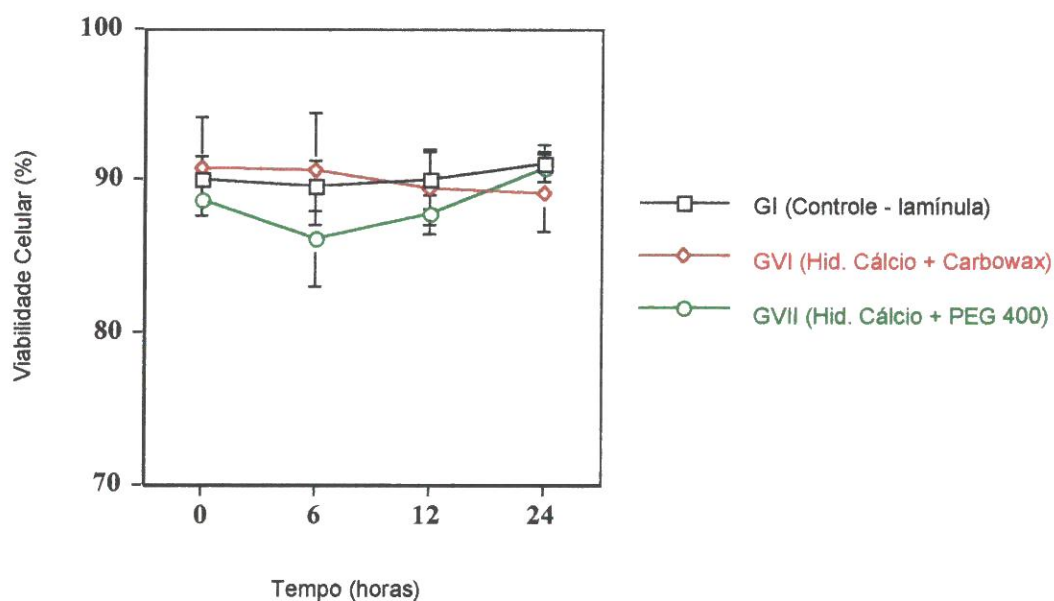


Figura 12 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GVI e GVII (resposta celular imediata ou de curto prazo)

O gráfico da Figura 13 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos IV (iodofórmio + carbowax) e VI (hidróxido de cálcio), nos diferentes tempos experimentais. Constatou-se que até o período de 12 horas (Figura 7), não há diferença estatística significativa. Porém, no período de 24 horas observa-se diferença estatística significativa entre os grupos IV (Figura 8) e VI (Figuras 10 e 11), como observa-se na Tabela 5.2.

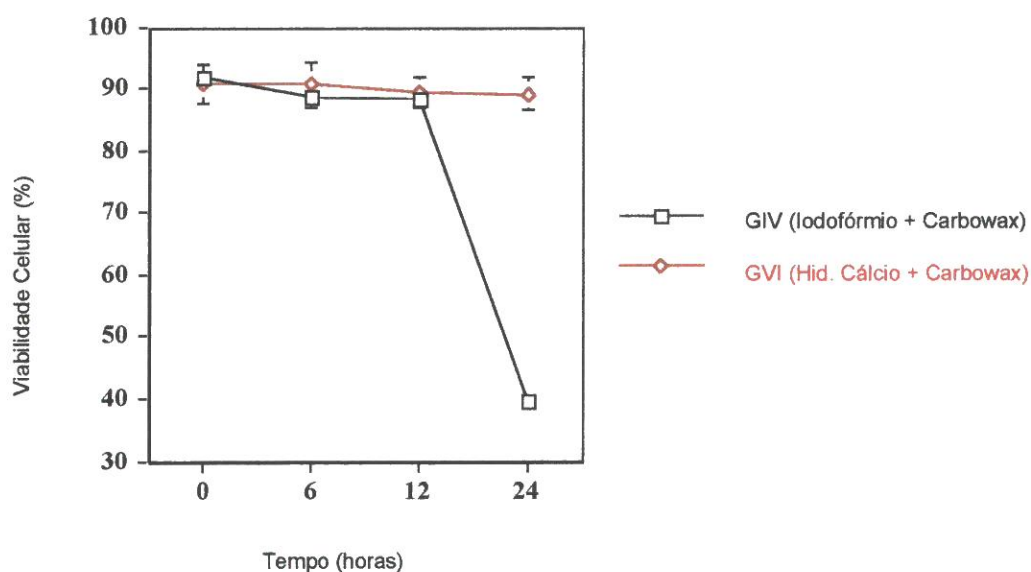


Figura 13 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GIV e GVI (resposta celular imediata ou de curto prazo)

O gráfico da Figura 14 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GV (iodofórmio + PEG 400) e GVII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Constata-se que até o período de 12 horas (Figura 7), não há diferença estatística significativa, porém após 24 horas verifica-se diferença estatística significativa entre os grupos GV (Figura 9) e GVII (Figura 10 e 11), conforme observa-se na Tabela 5.2.

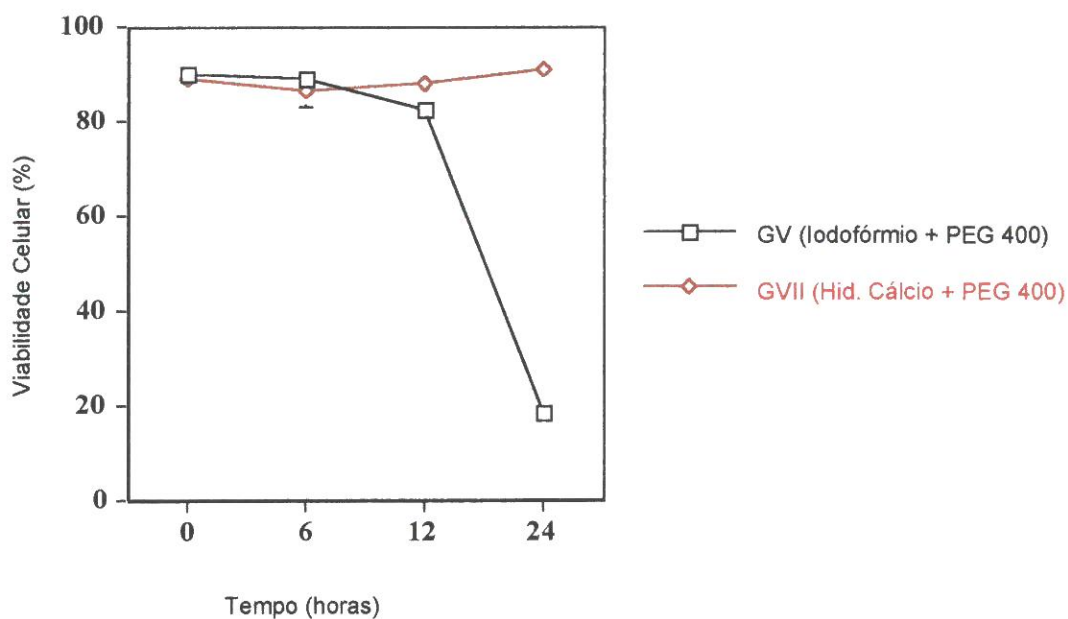


Figura 14 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referente aos grupos GV e GVII (resposta celular imediata ou de curto prazo)

PARTE B - Sobrevivência celular a longo prazo

Curvas de crescimento celular

Os valores correspondentes à média e erro da média dos números de células viáveis ($\times 10^4$) para o fator de variação: interação (tempo x medicação) estão descritos na Tabela 5.3. A partir destes dados foram realizadas as curvas de crescimento celular (Figuras 15, 19, 22, 27, 29 e 32).

TABELA 5.3 - Valores da média e erro da média correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$), distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de sobrevivência a longo prazo

Período Grupo	1 dia		3 dias		5 dias		7 dias	
	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média
GI	1,126	0,079	8,867	0,227	18,933	0,506	29,288	0,331
GII	0,932	0,076	4,703	0,551	14,677	0,516	28,504	1,380
GIII	0,632	0,080	3,611	0,262	10,011	0,535	23,955	0,580
GIV	0,817	0,028	4,333	0,318	15,867	0,985	27,622	2,188
GV	1,232	0,127	1,627	0,067	2,117	0,187	0,437	0,078
GVI	0,849	0,056	0,664	0,019	0,029	0,003	0,000	0,000
GVII	0,973	0,018	7,733	0,127	14,911	1,446	23,411	3,114
GVIII	0,657	0,026	4,354	0,673	10,300	0,719	10,255	0,307

O gráfico da figura 15 mostra a relação entre as curvas de crescimento celular referentes aos grupos: GI (controle - sem lamínula e sem substância), GII (Controle - só lamínula), GIII (carbowax) e GIV (PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Na Tabela 5.4 observa-se que, após 1 dia, não há diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 16); no dia 3 existe diferença entre os grupos: GI x GII, GI x GIII e GI x GIV (Figura 17); no dia 5 houve diferença estatística significativa entre os grupos: GI x GIII, GII x GIII e GIII x GIV; no dia 7 não observa-se diferença estatística significativa (Figura 18). Denota-se ainda que entre os dois grupos controle (GI x GII) só há diferença estatística significativa no dia 3. Entre os dois tipos de veículos (GIII x GIV) só observa-se diferença estatística significativa no dia 5 (Tabela 5.4).

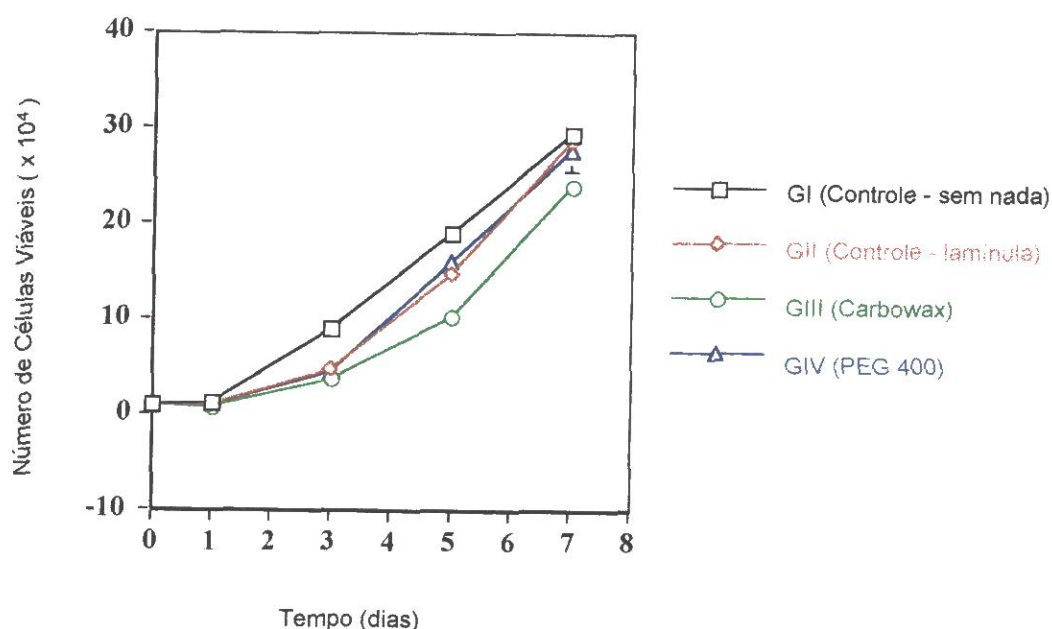


Figura 15 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII, GIII e GIV (sobrevivência a longo prazo)

Tabela 5.4 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores transformados dos números de células viáveis ($\times 10^4$), para o experimento de sobrevivência a longo prazo, nos diferentes períodos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 0,13356

Gráficos	Período Grupo	1 DIA		3 DIAS		5 DIAS		7 DIAS	
		Diferença entre médias	$\alpha =$ 5%	Diferença entre médias	$\alpha =$ 5%	Diferença entre médias	$\alpha =$ 5%	Diferença entre médias	$\alpha =$ 5%
Figura 15	GI x GII	0,042	ns	0,241 s		0,105	ns	0,013	ns
	GI x GIII	0,116	ns	0,331 s		0,259 s		0,085	ns
	GI x GIV	0,068	ns	0,268 s		0,074	ns	0,027	ns
	GII x GIII	0,074	ns	0,090	ns	0,154 s		0,072	ns
	GII x GIV	0,026	ns	0,027	ns	0,031	ns	0,014	ns
	GIII x GIV	0,048	ns	0,063	ns	0,185 s		0,058	ns
Figuras 19 e 22	GII x GV	0,062	ns	0,333 s		0,702 s		1,312 s	
	GII x GVI	0,019	ns	0,531 s		1,182 s		1,468 s	
	GV x GVI	0,081	ns	0,198 s		0,480 s		0,156 s	
Figura 27	GII x GVII	0,010	ns	0,189 s		0,003	ns	0,088	ns
	GII x GVIII	0,066	ns	0,031	ns	0,143 s		0,417 s	
	GVII x GVIII	0,076	ns	0,220 s		0,146 s		0,329 s	
Figura 29	GV x GVII	0,052	ns	0,522 s		0,705 s		1,224 s	
Figura 32	GVI x GVIII	0,047	ns	0,500 s		1,039 s		1,051 s	

ns - não significante

s - significante

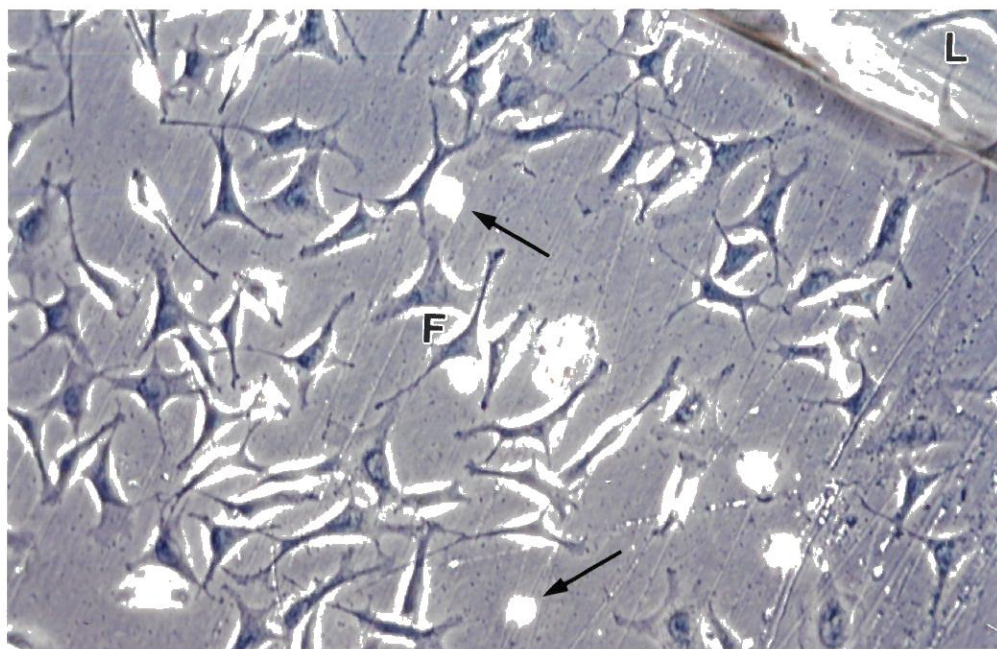


Figura 16 - Fotografia ilustrando o crescimento dos fibroblastos NIH 3T3 (PEG 400). Após 1 dia do plaqueamento e colocação da substância, observa-se em todos os grupos poucas células, de aspecto fusiforme ou estrelário (F) e, muitas células em divisão (setas). No canto superior direito observa-se parte da lamínula (L) (x200)

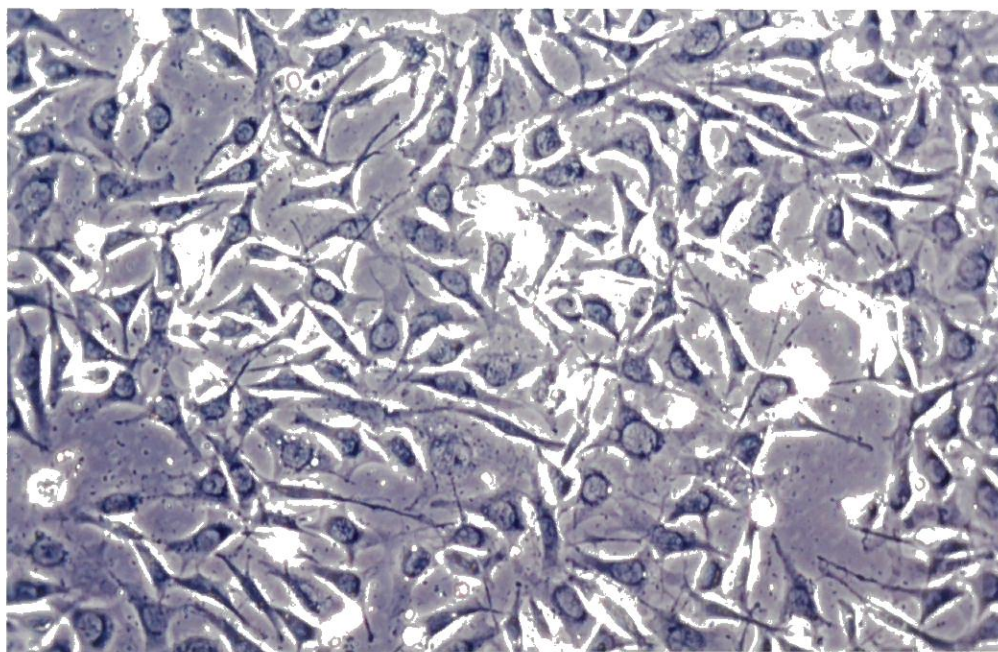


Figura 17 - Após 3 dias (PEG 400) do plaqueamento há um maior número de células; a cultura está em subconfluência e os aspectos morfológicos são similares aos da Figura 16 (x200)

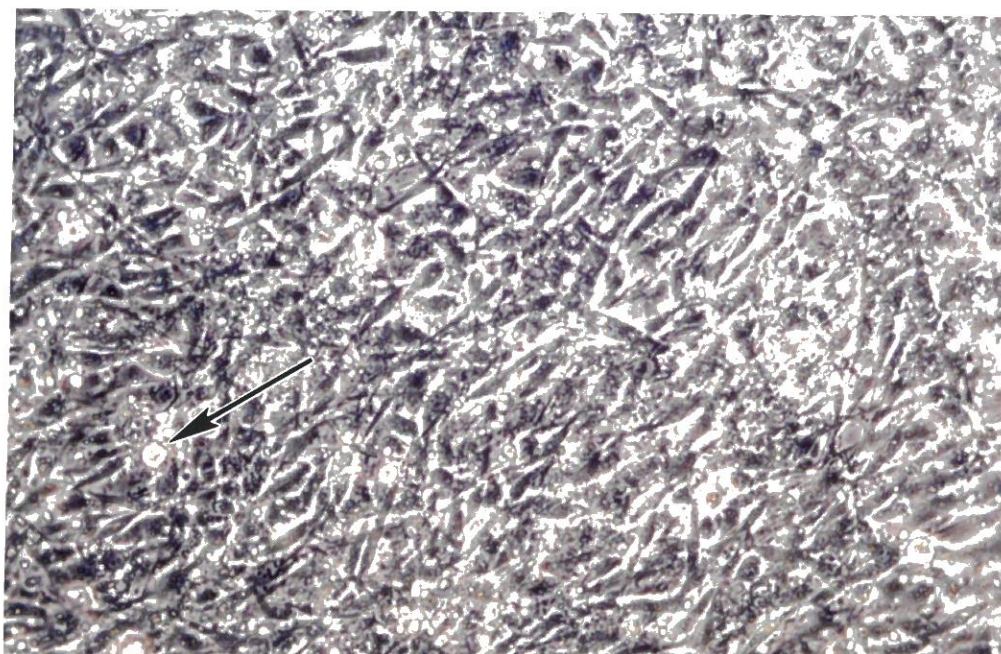


Figura 18 - Após 7 dias (carbowax) do plaqueamento, a cultura apresenta-se confluenta para todos os grupos, com grande número de células fusiformes e poucas células estão em divisão (seta) (x200)

O gráfico da figura 19 mostra a relação entre as curvas de crescimento celular referentes aos grupos GII (lamínula), GV (iodofórmio + carbowax) e GVI (iodofórmio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Observa-se que, após 1 dia, não há diferença estatística significativa entre os grupos (Figuras 20 e 21); no entanto, após 3, 5 e 7 dias do contato das células com a medicação ou lamínula de vidro, observa-se diferença estatística significativa entre os grupos: GII x GV, GII x GVI e GV x GVI (Tabela 5.4).

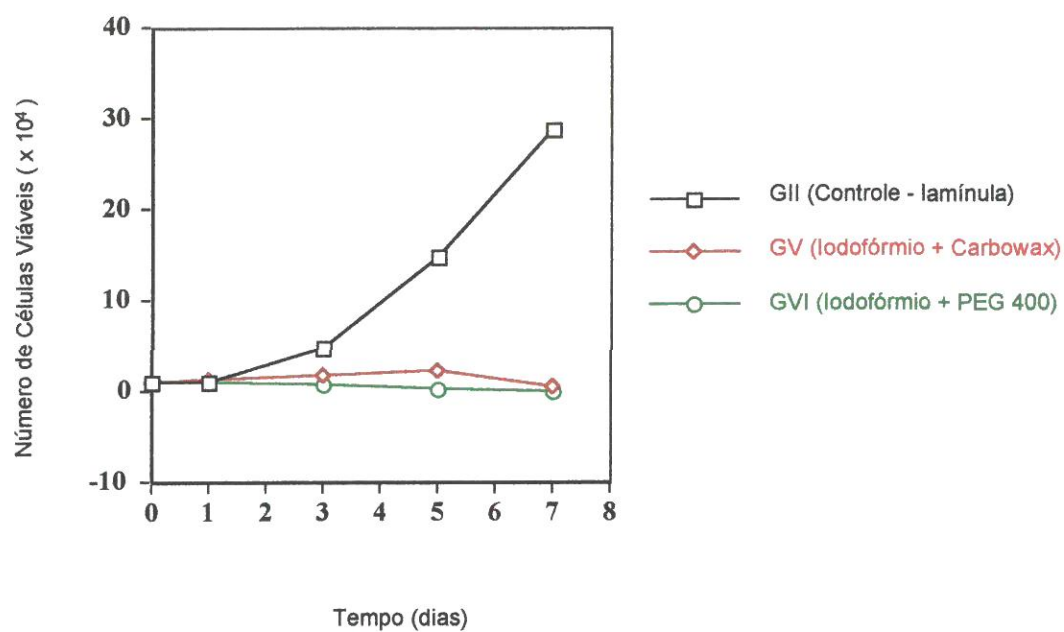


Figura 19 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GV e GVI (sobrevivência a longo prazo)

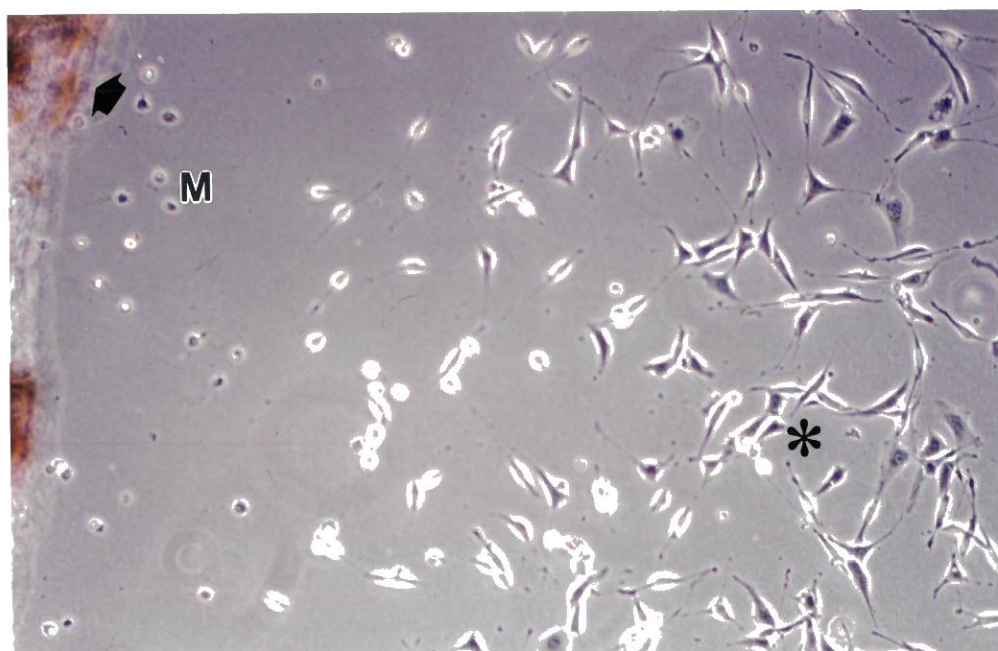


Figura 20 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 1 dia observa-se halo de inibição ao redor da lamínula de vidro com a substância (seta), com células mortas (M) e, mais afastado da lamínula, células aderidas ao substrato (*) (X100)

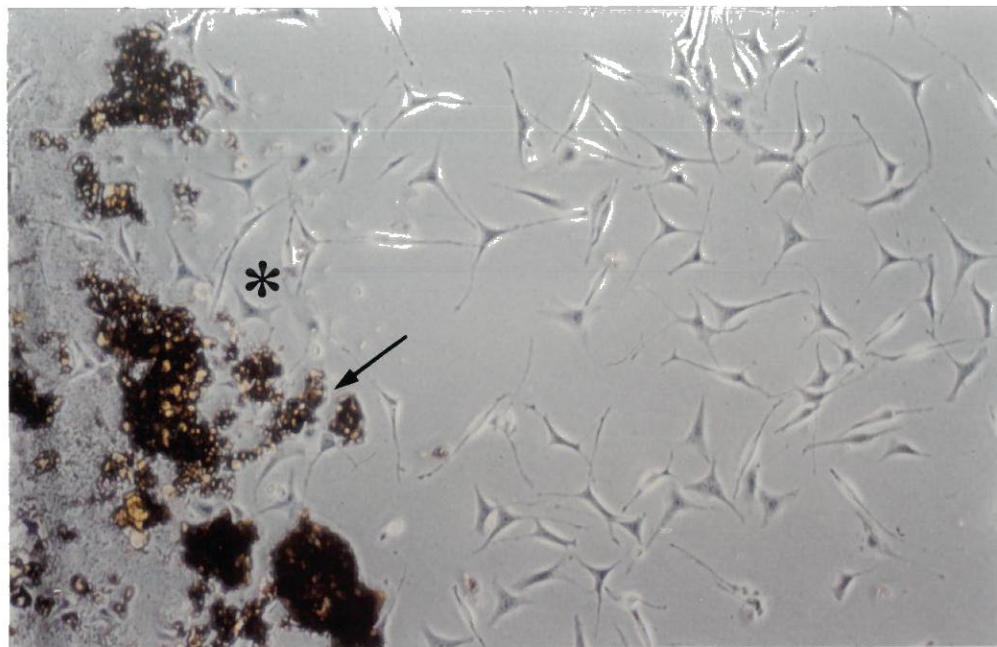


Figura 21 - Culturas tratadas com iodoformio + PEG 400 (GVI). Após 1 dia as células têm aspecto estrelário (*) e estão aderidas ao substrato em meio aos fragmentos da pasta (seta), de forma similar ao iodoformio + carbowax (GV) (X100)

O gráfico da figura 22 mostra, em detalhes, a diferença existente entre as curvas de crescimento celular referentes aos grupos GV (iodoformio + carbowax) e GVI (iodoformio + PEG 400), após 3, 5 e 7 dias (Figuras 23, 24, 25, 26), conforme verifica-se na Tabela 5.4.

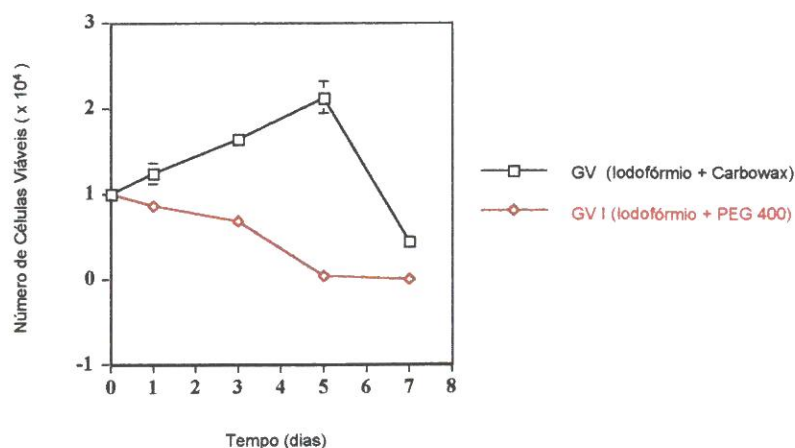


Figura 22 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVI (sobrevivência a longo prazo)



Figura 23 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 5 dias algumas áreas estão preenchidas com células de aspecto fusiforme e células em divisão (seta) (x100)

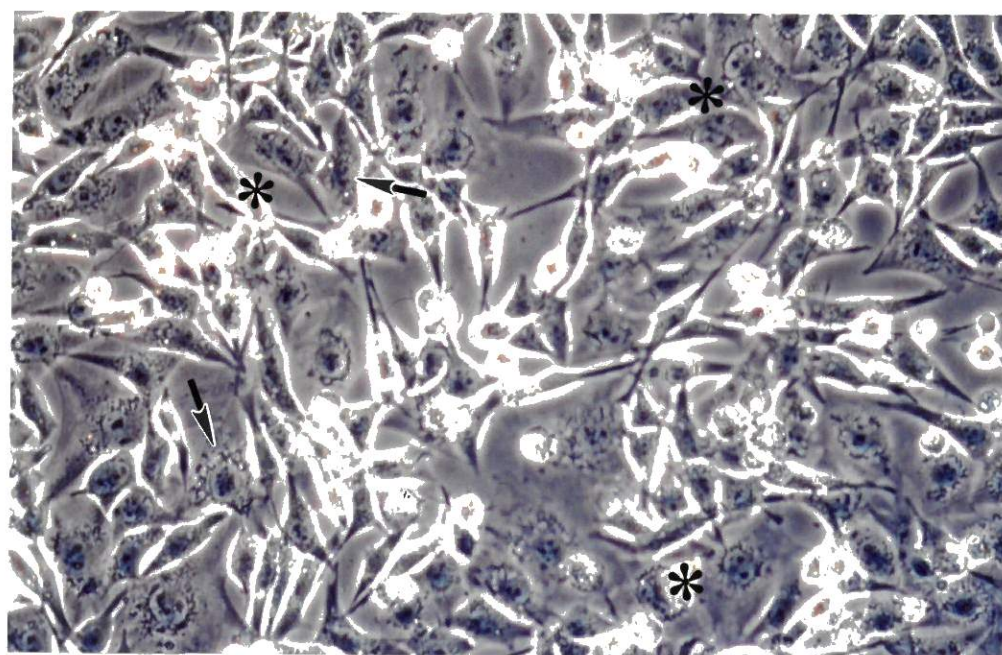


Figura 24 - Culturas tratadas com iodofórmio + carbowax (GV). Após 7 dias, a cultura apresenta células com alterações morfológicas indicativas de degeneração, representadas por células multinucleadas (*) e granulações ou vesículas intracitoplasmáticas na região perinuclear (setas). Apenas algumas áreas apresentam este aspecto com células (x200)

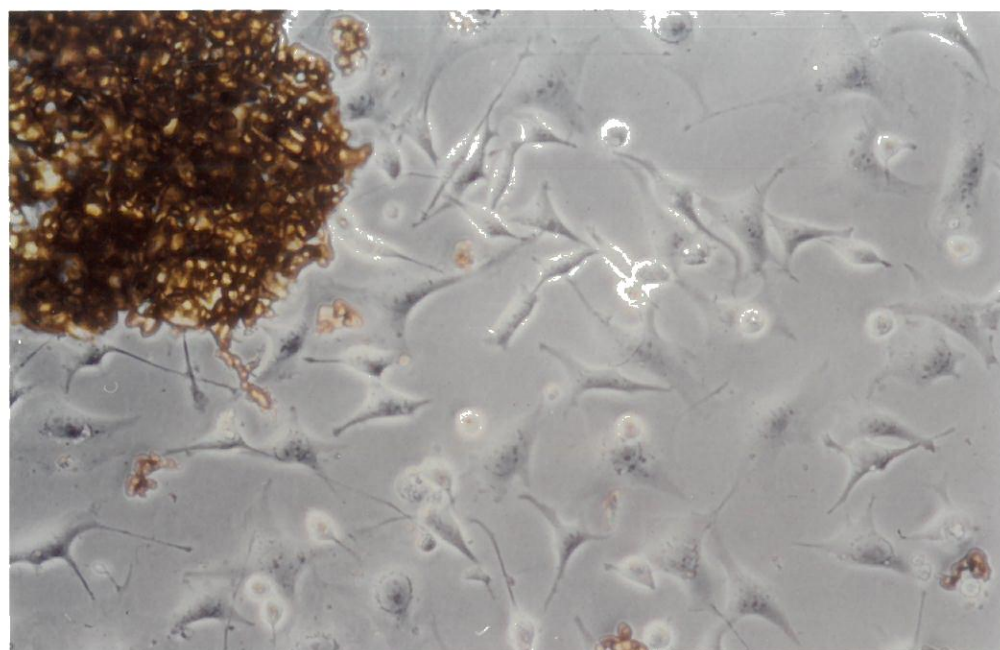


Figura 25 - Culturas tratadas com iodofórmio + PEG 400 (GVI). Após 3 dias, o número de células não aumentou (x200)

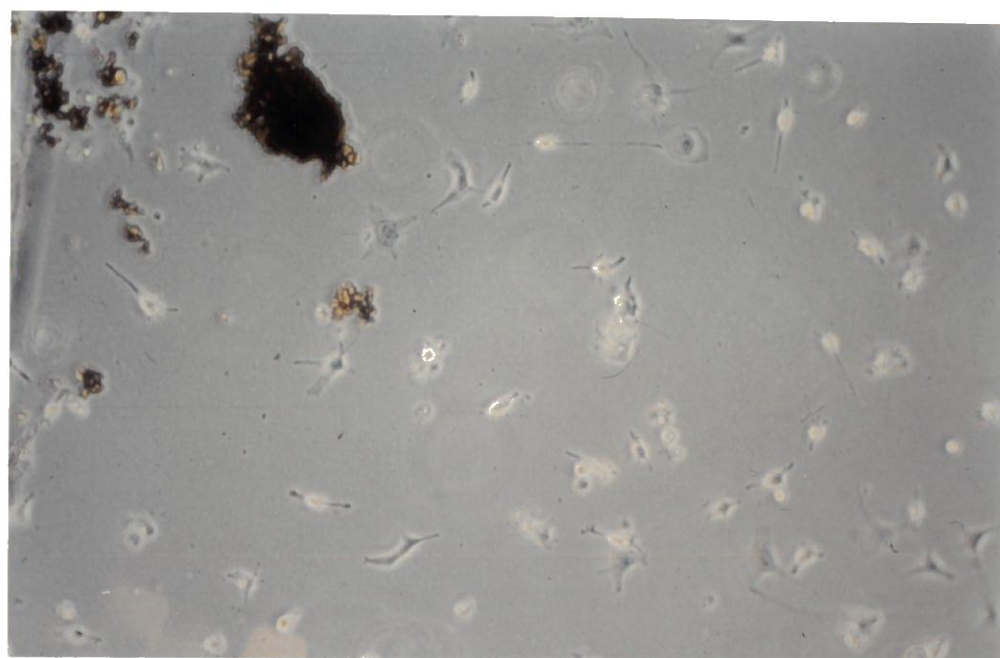


Figura 26 - Culturas tratadas com iodofórmio + PEG 400 (GVI). A partir do dia 5 são poucas as células que permanecem aderidas à placa de Petri (x100)

O gráfico da figura 27 mostra a relação entre as curvas de crescimento celular referentes aos grupos GII (controle), GVII (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVIII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Observa-se que não houve diferença estatística significativa no período de 1 dia (Figura 28). No entanto, essa diferença estatística é significativa entre os grupos: GII x GVII apenas no terceiro dia do contato das células com a medicação; GII x GVIII, nos dias 5 e 7; e entre GVII x GVIII, a partir do dia 3 (Tabela 5.4).

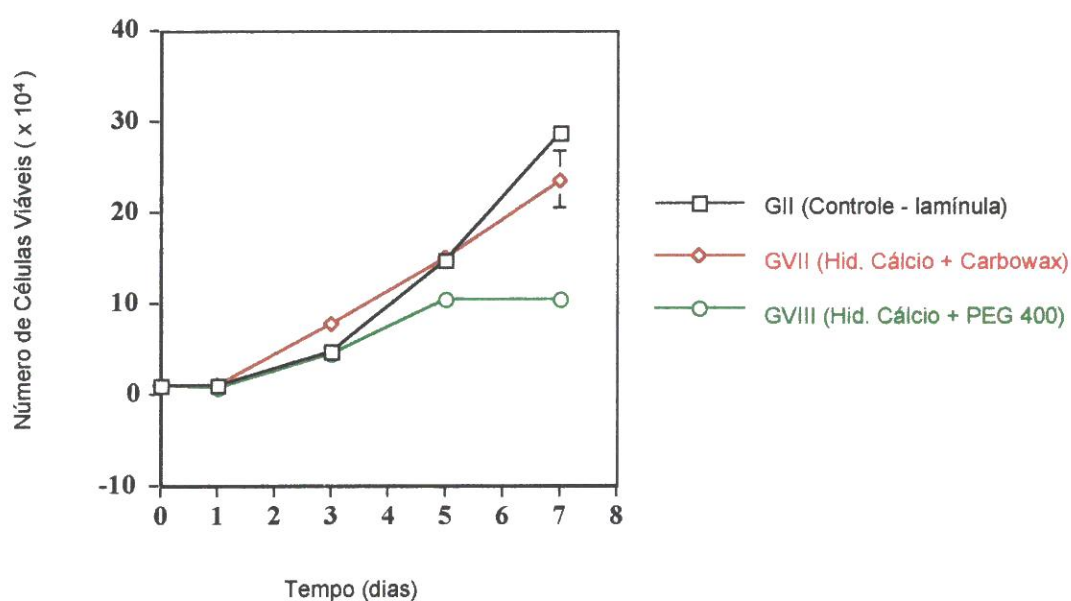


Figura 27 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GVII e GVIII (sobrevivência a longo prazo)

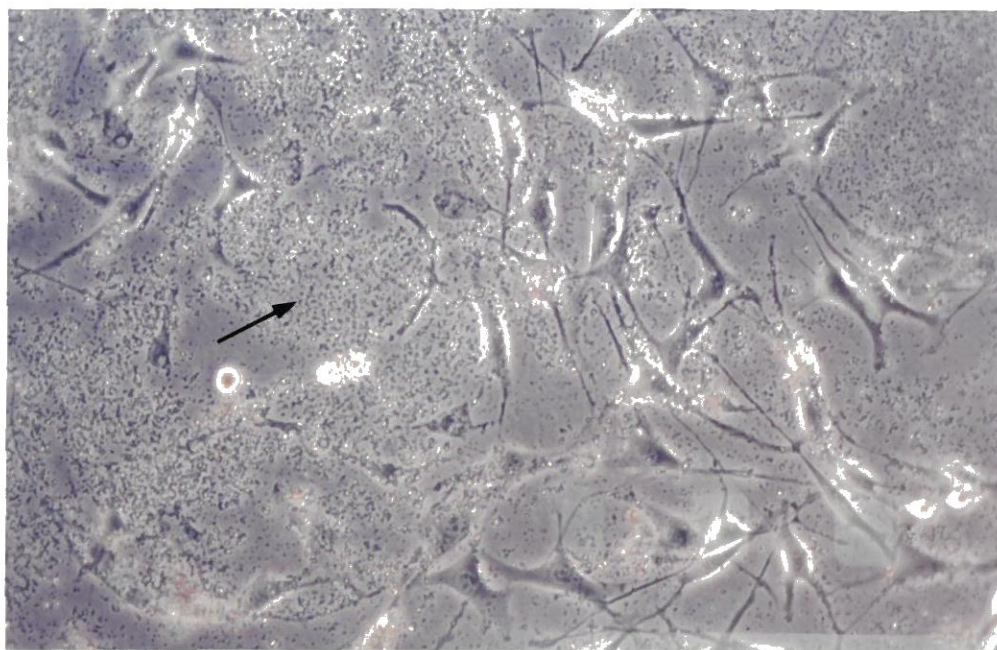


Figura 28 - Poucas células de aspecto fusiforme nas culturas tratadas com hidróxido de cálcio + carbowax (GVII) e hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII), de permeio à substância (seta) que se difundiu na placa de Petri. Essa difusão foi mais encontrada quando o veículo utilizado foi o PEG 400. Aspecto 1 dia após (x200)

O gráfico da figura 29 mostra a relação entre as curvas de crescimento celular referentes aos grupos GV (iodofórmio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + carbowax), nos diferentes tempos experimentais. Constata-se que até o período de 1 dia não há diferença estatística significativa (Figura 20), porém, após 3 (Figura 30), 5 (Figura 23) e 7 dias (Figuras 24 e 31) do contato das células com a substância houve diferença estatística significativa entre os dois grupos (Tabela 5.4).

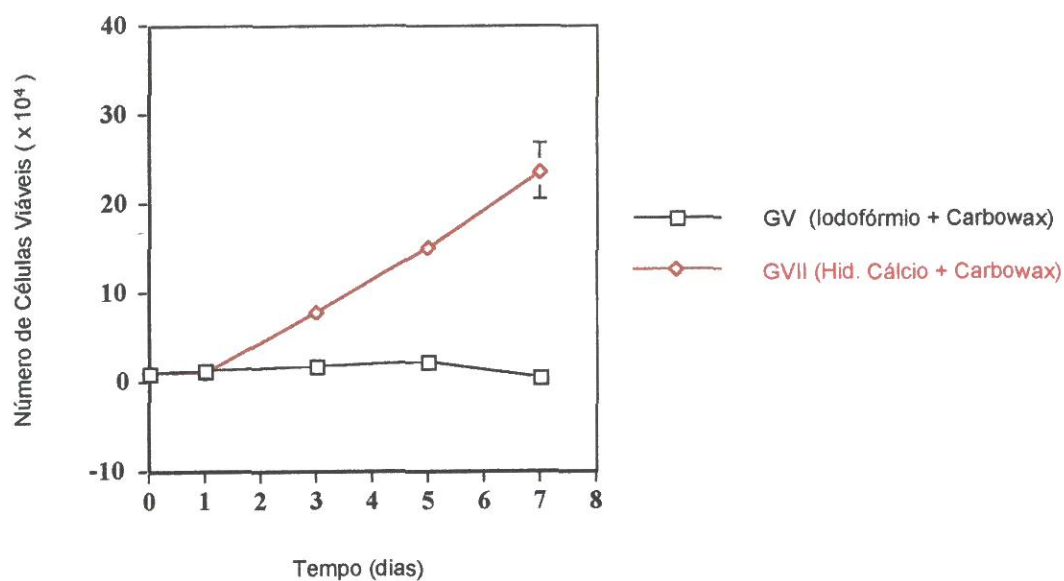


Figura 29 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVII (sobrevivência a longo prazo)

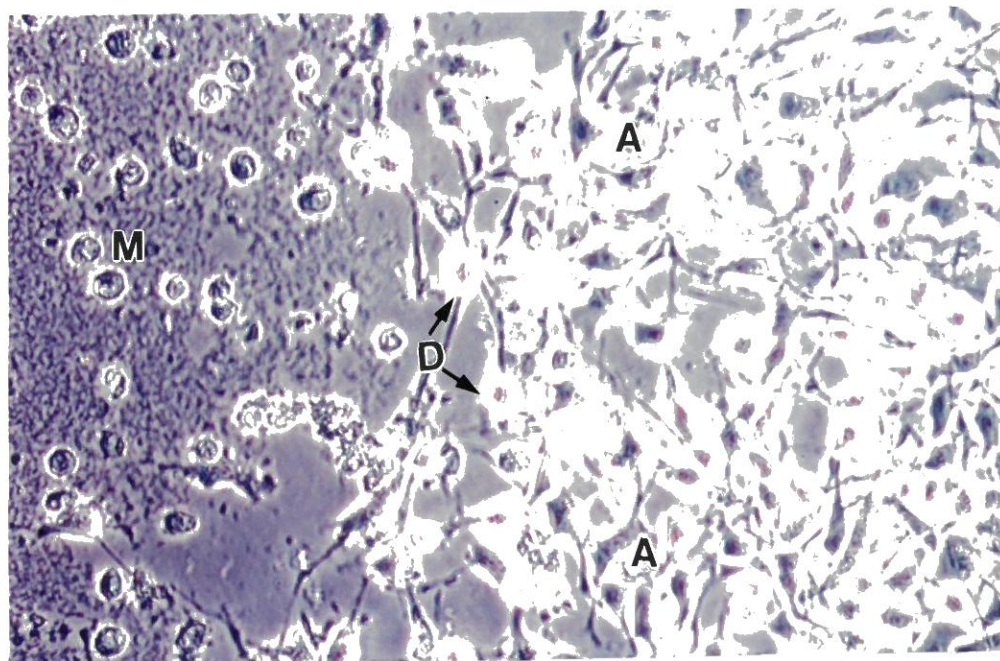


Figura 30 - Após 3 dias encontra-se um halo de inibição contendo células mortas (M), mas também com muitas células aderidas (A) e em divisão (D), tanto nas culturas tratadas com hidróxido + carbowax (GVII), como com hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII) ($\times 200$)

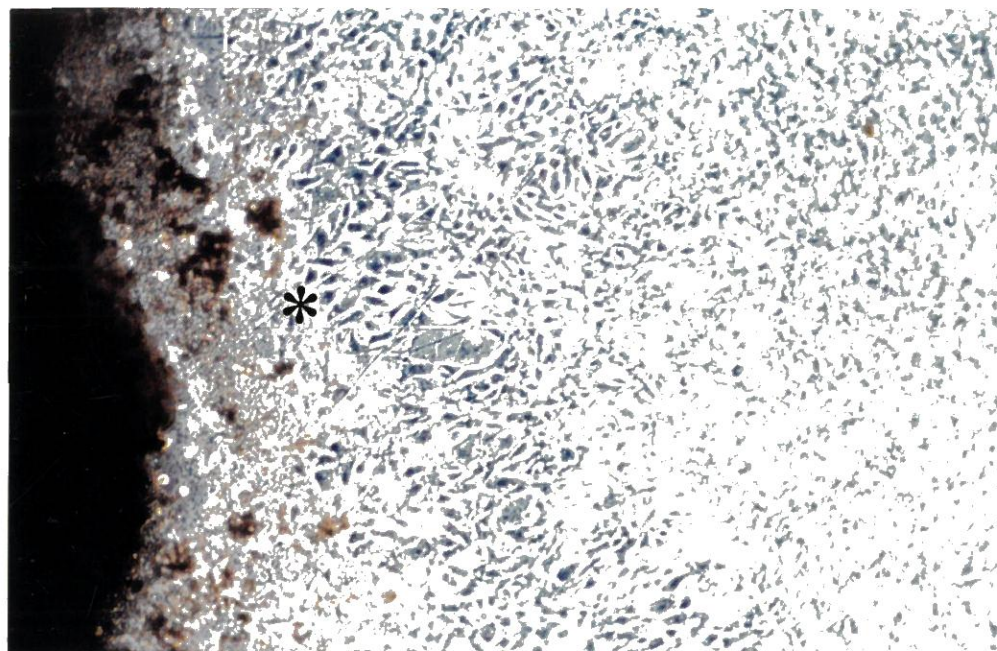


Figura 31 - Nas culturas tratadas com hidróxido + carbowax (GVII) e hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII), após 7 dias, independente do veículo utilizado, todas as culturas confluíram e o halo de inibição foi preenchido com células de aspecto fusiforme (*) (x100)

O gráfico da figura 32 mostra a relação entre as curvas de crescimento celular de longo prazo referentes aos grupos GVI (iodofórmio + PEG 400) e GVIII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Denota-se que até o período de 1 dia não há diferença estatística significativa (Figuras 21 e 28), no entanto, após 3, 5 e 7 dias (Figuras 25, 26 e 31) do contato das células com a substância observa-se diferença estatística significativa entre os dois grupos (Tabela 5.4).

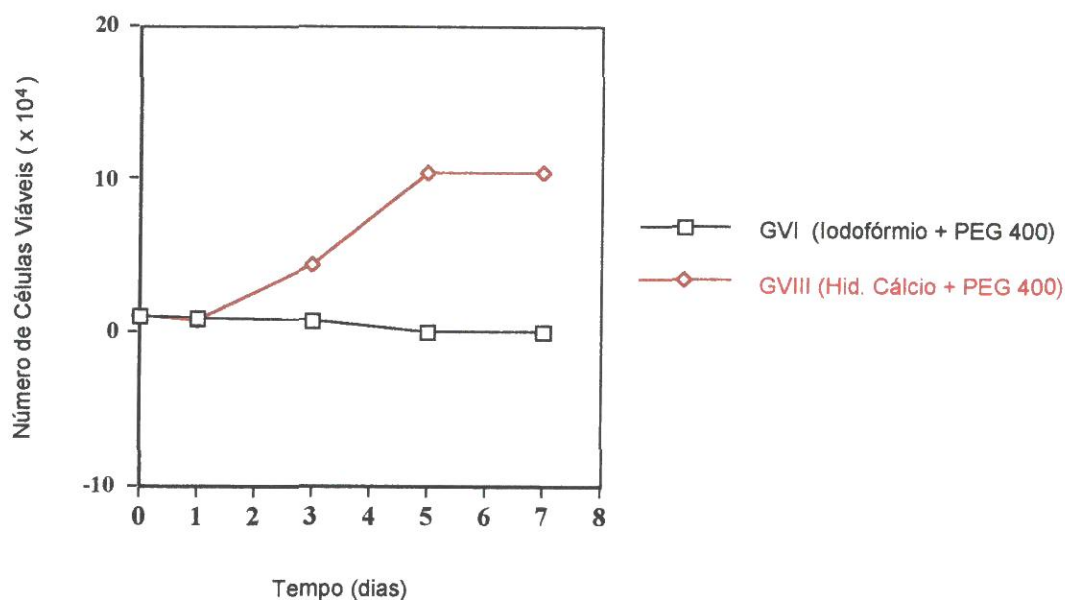


Figura 32 - Curvas de crescimento celular, expressas em número de células viáveis ($\times 10^4$) em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GVI e GVIII (sobrevivência celular a longo prazo)

PARTE C - Sobrevivência celular a longo prazo

Curvas de viabilidade celular

Os valores correspondentes à média e erro da média das porcentagens de viabilidade celular para o fator de variação: (tempo x medicação), segundo os tempos experimentais, estão descritos, na Tabela 5.5. A partir destes dados foram construídos os gráficos das curvas de viabilidade celular (Figuras 33, 34, 35, 36 e 37).

TABELA 5.5 - Valores da média e erro da média correspondentes à viabilidade celular, expressos em porcentagem, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de longo prazo

Período	1 dia		3 dias		5 dias		7 dias	
Grupo	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média	Média	Erro da Média
GI	90,560	1,876	93,455	2,283	90,661	1,264	90,134	1,044
GII	82,984	1,569	89,462	1,484	82,599	0,959	84,665	3,460
GIII	85,263	0,297	86,960	1,077	83,579	3,998	88,515	1,083
GIV	84,584	1,686	88,564	2,649	79,606	5,085	80,380	3,447
GV	92,609	0,475	86,658	2,409	88,653	0,841	28,004	6,480
GVI	90,478	0,428	80,798	1,447	5,533	0,682	0,000	0,000
GVII	81,582	2,685	87,738	1,517	85,309	1,733	86,991	1,526
GVIII	77,087	4,813	85,402	3,646	82,014	4,619	88,898	0,585

O gráfico da figura 33 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GI (controle sem lamínula e sem substância) , GII (controle - lamínula), GIII (carbowax) e GIV (PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Por meio desse gráfico constata-se que não há diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum período experimental (Tabela 5.6).

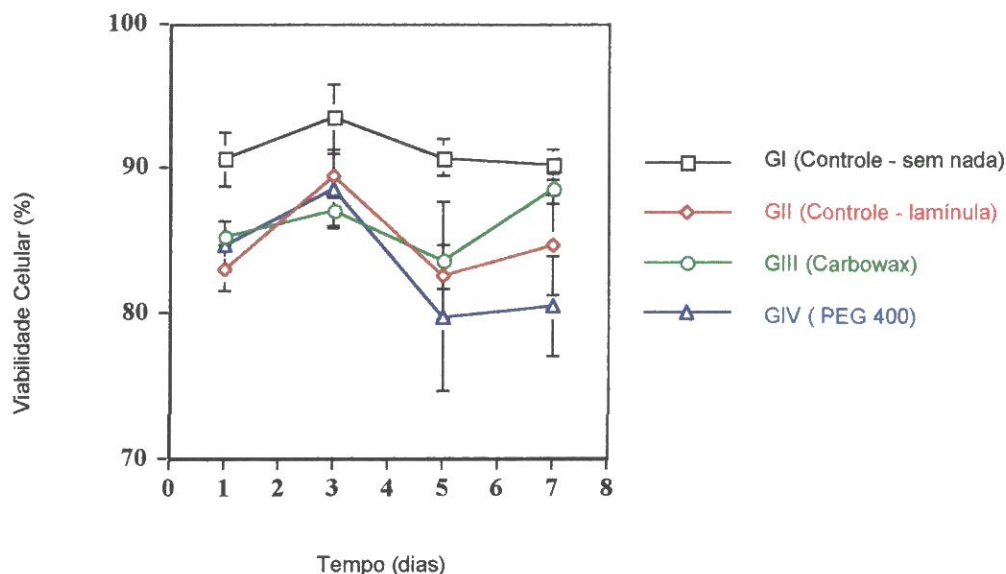


Figura 33 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular, em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GI, GII, GIII e GIV (sobrevivência a longo prazo)

Tabela 5.6 - Comparação das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular, para o experimento de longo prazo, nos diferentes períodos experimentais, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 14,69341

Gráficos	Período Grupo	1 DIA		3 DIAS		5 DIAS		7 DIAS	
		Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$
Figura 33	GI x GII	7,576	ns	3,993	ns	8,062	ns	5,469	ns
	GI x GIII	5,297	ns	6,495	ns	7,082	ns	1,619	ns
	GI x GIV	5,976	ns	4,891	ns	11,055	ns	9,754	ns
	GII x GIII	2,279	ns	2,502	ns	0,980	ns	3,850	ns
	GII x GIV	1,600	ns	0,898	ns	2,993	ns	4,285	ns
	GIII x GIV	0,679	ns	1,604	ns	3,973	ns	8,135	ns
Figura 34	GII x GV	9,625	ns	2,804	ns	6,054	ns	56,661	s
	GII x GVI	7,494	ns	8,664	ns	77,066	s	84,665	s
	GV x GVI	2,131	ns	5,860	ns	83,120	s	28,004	s
Figura 35	GII x GVII	1,402	ns	1,724	ns	2,710	ns	2,326	ns
	GII x GVIII	5,897	ns	4,060	ns	0,585	ns	4,233	ns
	GVII x GVIII	4,495	ns	2,336	ns	3,295	ns	1,907	ns
Figura 36	GV x GVII	11,027	ns	1,080	ns	3,344	ns	58,987	s
Figura 37	GVI x GVIII	13,391	ns	4,604	ns	76,481	s	88,898	s

ns - não significante

s - significante

O gráfico da figura 34 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GII (controle - lamínula), GV (iodofórmio + carbowax) e GVI (iodofórmio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Pela Tabela 5.6 verifica-se que não há diferença estatística significativa no período de 1 (Figuras 20 e 21) e 3 dias. No entanto, após 5 dias (Figuras 23 e 26) do contato das células com a medicação observa-se diferença estatística significativa entre os grupos: GII x GVI e GV x GVI; e, após 7 dias (Figuras 24 e 26) existe diferença significativa entre os grupos: GII x GV, GII x GVI e GV x GVI (Tabela 5.6).

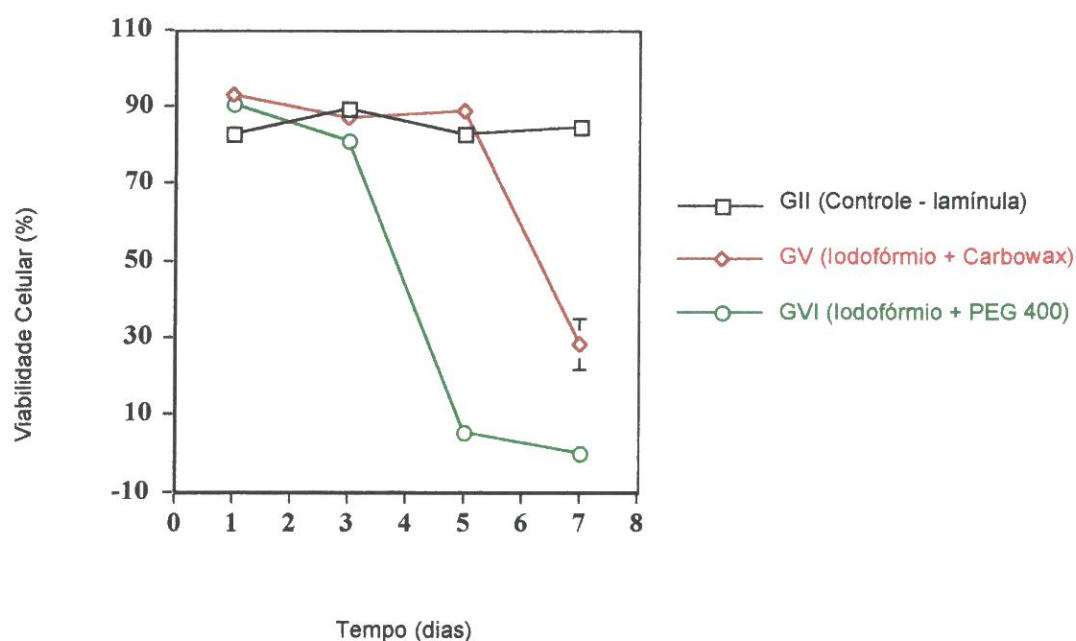


Figura 34 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GV e GVI (sobrevivência a longo prazo)

O gráfico da figura 35 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GII (controle - lamínula) , GVII (hidróxido de cálcio + carbowax) e GVIII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Pela Tabela 5.6 pode-se afirmar que não há diferença estatística significativa em nenhum período experimental (Figuras 28, 30 e 31).

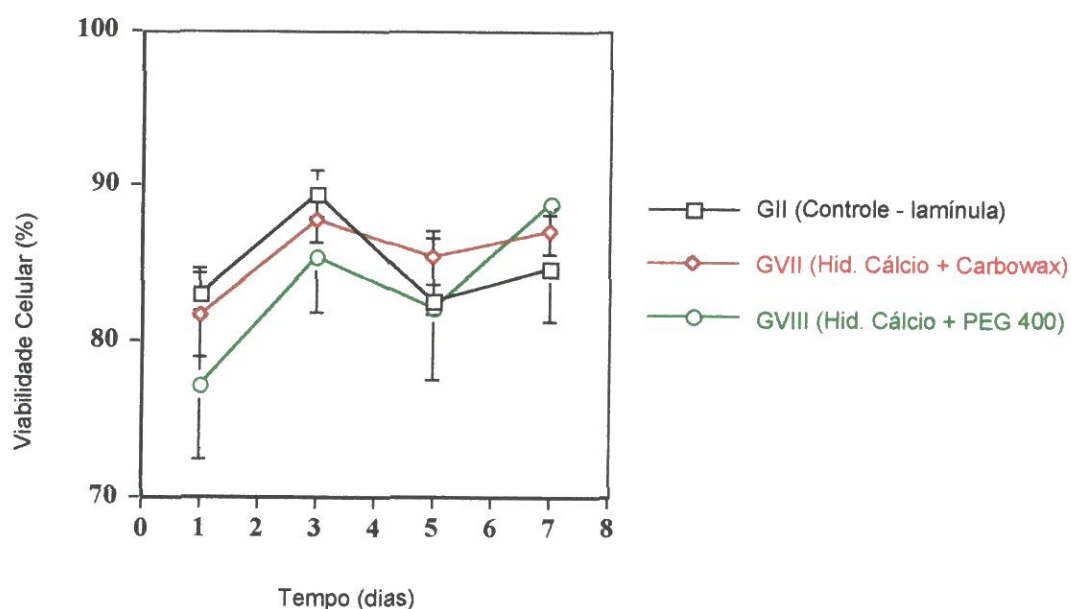


Figura 35 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GII, GVII e GVIII (sobrevivência a longo prazo)

O gráfico da figura 36 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GV (iodofórmio + carbowax) e GVII (hidróxido de cálcio + carbowax), nos diferentes tempos experimentais. Constatase que até o período de 5 dias não existe diferença estatística significativa, contudo, após 7 dias (Figuras 24 e 31) do contato das células com a substância observa-se diferença estatística significativa entre os dois grupos (Tabela 5.6).

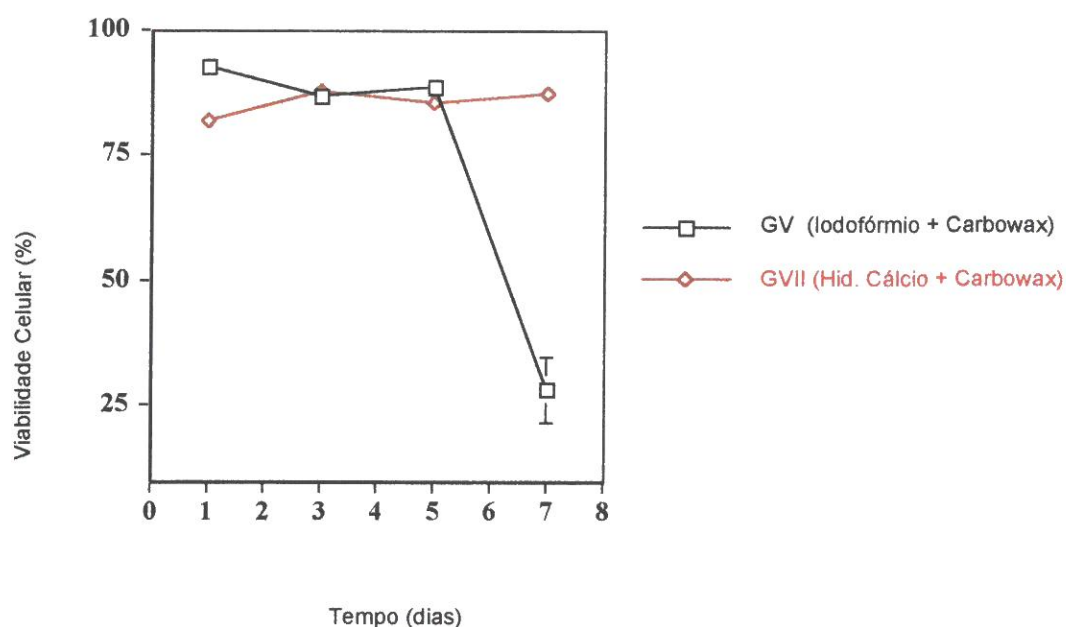


Figura 36 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GV e GVII (sobrevivência a longo prazo)

O gráfico da figura 37 mostra a relação entre as curvas de viabilidade celular, expressas em porcentagem, referentes aos grupos GVI (iodofórmio + PEG 400) e GVIII (hidróxido de cálcio + PEG 400), nos diferentes tempos experimentais. Por meio desse gráfico denota-se que até o período de 3 dias (Figuras 21, 25, 28 e 30) não há diferença estatística significativa, entretanto, após 5 e 7 dias (Figuras 26 e 31) do contato das células com a substância observa-se diferença estatística significativa entre os dois grupos, o que pode ser visto na Tabela 5.6.

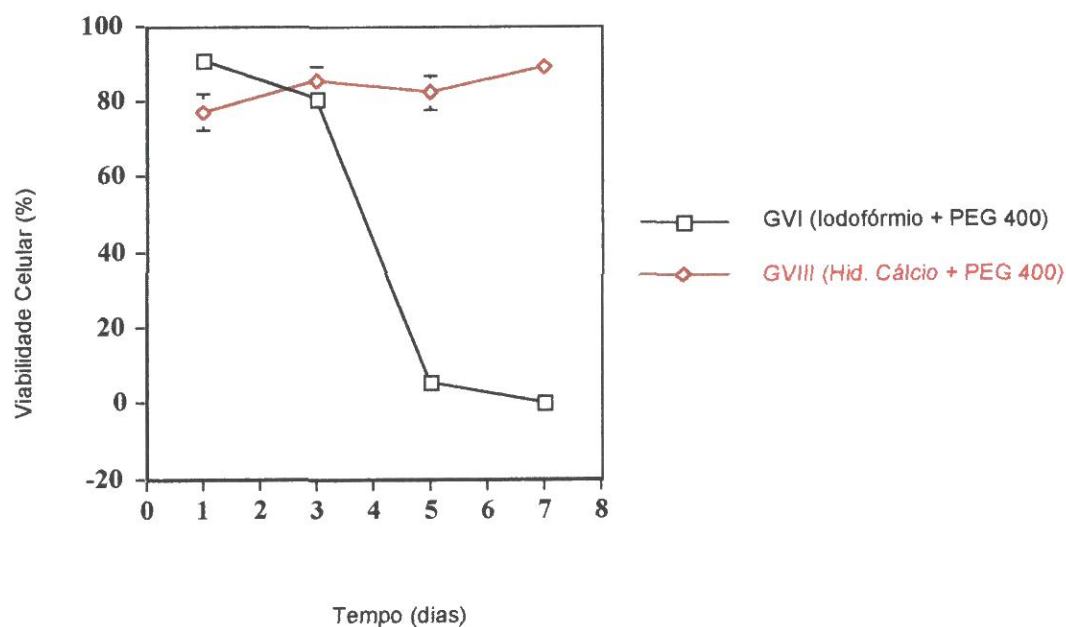


Figura 37 - Curvas da porcentagem de viabilidade celular em função dos diferentes tempos experimentais, referentes aos grupos GVI e GVIII (sobrevivência a longo prazo)

6. DISCUSSÃO

As lesões periapicais representam uma resposta inflamatória frente aos estímulos nocivos oriundos do sistema de canais radiculares, sendo que os fatores etiológicos envolvem bactérias e seus metabólitos, tecidos necrosados ou irritação química (Ramachandran Nair, 1987; Mölven et al., 1991; Paiva; Antoniazzi, 1993). Numerosos estudos têm mostrado que infecções do canal radicular são de origem polimicrobiana, dominadas por anaeróbios (Miller, 1894; Möller et al., 1981; Ramachandran Nair, 1987; Ranta et al, 1988; Haapasalo, 1989; Mölven et al., 1991). O processo de reparo da lesão periapical inicia com a inflamação aguda manifestada nas primeiras fases da cicatrização e, após a eliminação da causa, o reparo sobrepõe a resposta inflamatória (Heithersay, 1970). No entanto, a persistência de infecção, mesmo após adequado preparo químico-cirúrgico e obturação do canal radicular, pode ser creditado à presença de bactérias localizadas na superfície externa da raiz, em núcleos de difícil acesso às manobras realizadas no interior dos canais radiculares e às células fagocitárias, caracterizando, assim, a infecção extra-radicular ou "lesão refratária" (Boyle, 1934; Bystrom et al., 1987; Tronstad et al., 1987; Iwu et al.,

1990; Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Ramachandran Nair et al., 1990; Reader et al., 1994; Yared & Dagher, 1994).

A evidência da localização de bactérias fora do canal radicular tem conduzido à necessidade de utilizarmos medicações efetivas no combate a tais microrganismos, com a finalidade de evitarmos as cirurgias parendodônticas e suas conseqüências. Assim sendo, como recursos clínicos disponíveis, medicamentos são empregados na tentativa de se atingir essas regiões, dentre os quais destacam-se o iodofórmio e o hidróxido de cálcio, geralmente empregados sob a forma de pastas (Nichols, 1984; Leonardo et al., 1976; Maisto, 1975).

No que se refere ao iodofórmio, apesar de ter sido descoberto há mais de 150 anos (Serullas, 1829 apud Velázquez, 1955), observam-se relatos controversos na literatura com relação as suas propriedades, sendo levantadas muitas dúvidas quanto ao seu emprego como medicação intracanal.

Quimicamente, o iodofórmio corresponde ao triiodometano (CHI_3) ou triodeto de formol (Thoms, 1930), com alto teor de iodo, em torno de 96% (Prinz; Rickert, 1941; Pucci, 1945), sendo facilmente dissolvido em álcool, éter ou gorduras, liberando iodo em estado nascente, exercendo assim sua propriedade anti-séptica (Sturridge, 1924; Prinz; Rickert, 1941; Pucci, 1945; Sollman, 1957; Velázquez, 1955). É ligeiramente anestésico (Pucci, 1945; Sollman, 1957; Bazerque, 1976) e volatiliza lentamente quando exposto ao ar e à temperatura ambiente e, mais rapidamente, a uma

temperatura constante de 37°C, liberando iodo (Maisto, 1975; Velázquez, 1955; Bazerque, 1976).

As razões para o abandono do iodofórmio como medicação intracanal eram atribuídas às seguintes propriedades que apresentavam-se como características negativas: odor penetrante e desagradável (De Terra, 1896; Camargo, 1926; Prinz; Rickert, 1941; Sollman, 1957; Bazerque, 1976); alteração cromática dos dentes (Camargo, 1926; Garcia-Godoy, 1987). Outro aspecto discutido está relacionado à possibilidade de desenvolver reações adversas, os relatos são pouco consistentes, tendo sido atribuído ao fato do alto teor de iodo presente na composição do iodofórmio (De Terra, 1896; Goransson, 1957 apud Nichols, 1984; Sollman, 1957; Camargo, 1926; Velázquez, 1955; Litter, 1964; Held, 1964). No entanto, tais reações só ocorrem naqueles pacientes sensíveis ao iodo, condição que afeta apenas uma pequena porcentagem da população (Castagnola; Orlay, 1952; Velázquez, 1955; Goransson, 1957 apud Nichols, 1984), ou quando administrado em grandes quantidades (Prinz; Rickert, 1941). Se for bem administrado, raramente há intoxicações (De Terra, 1896; Prinz; Rickert, 1941; Litter, 1964). Entretanto, como medicação intracanal, não observamos relatos na literatura estudada quanto ao desenvolvimento de reações desse tipo.

Outra propriedade bastante discutida refere-se à capacidade anti-séptica do iodofórmio. Alguns autores afirmaram que o iodofórmio é um fraco anti-séptico, apenas inibindo o crescimento da bactéria, pela oxidação dos produtos da atividade bacteriana, não tendo ação bactericida (De Terra,

1896; Camargo, 1926; Prinz; Rickert, 1941; Pucci, 1945; Giovacchini, 1947 apud Aydos & Milano, 1984). Entretanto, outros autores relataram a sua forte ação anti-séptica (Sarrazin, 1924), inibindo o crescimento bacteriano ou agindo sobre suas toxinas (Agostini, 1934). Todavia, uma das explicações para o seu poder anti-séptico referem-se à potencialização do seu efeito quando em contato com secreções ou áreas infectadas, liberando iodo em estado nascente (Prinz; Rickert, 1941; Pucci, 1945). Esta afirmação, ainda não comprovada, induziu a algumas considerações, tais como, a ligação desta substância com as proteínas bacterianas, precipitando-as, ou então, pela oxidação e iodização dos elementos do protoplasma bacteriano (Litter, 1964). Por sua vez Held (1964) sugeriu que o iodofórmio não exerce ação direta sobre os germes, porém tem efeito sobre os tecidos ou sobre o líquido celular, atenuando as condições de crescimento do germe. Portanto, no tocante a essa propriedade anti-séptica, observa-se que os relatos existentes carecem de novos estudos.

Quanto ao seu uso como material obturador em Endodontia existiu uma preocupação com relação à reabsorção do iodofórmio dentro do canal radicular, o que resultaria muitas vezes na criação de um "espaço morto", sem mecanismo de defesa contra a infecção (Juge, 1959). Para contornar esse inconveniente recomendou-se a utilização de uma pasta lentamente reabsorvível na região periapical, com maior quantidade de óxido de zinco e eugenol para preencher o canal (Iglesias et al., 1965; Maisto, 1965) e uma pasta rapidamente reabsorvível na região periapical, a qual sofreria desintegração, provocando uma reação tecidual mais intensa, sendo

mais rapidamente reabsorvida. No entanto, tal preocupação existiu devido à necessidade de se manter o selamento hermético do canal para prevenir a penetração de fluidos teciduais e evitar a sua posterior reinfecção. Como medicação intracanal, tal preocupação não é relevante, uma vez que indicasse o controle radiográfico periódico para verificar o grau de reabsorção da pasta e a diminuição ou desaparecimento da alteração periapical, permitindo dessa forma a substituição da medicação, em caso de reabsorção da mesma, ou a complementação do tratamento endodôntico pela obturação definitiva do canal radicular.

Como propriedades positivas do iodofórmio observamos na literatura os seguintes achados: por ser uma substância acentuadamente radiopaca é possível visualizarmos, radiograficamente, o preenchimento correto do canal radicular e o grau de penetração da medicação nos tecidos periapicais, controlando sua reabsorção periódica. Isso é possível uma vez que a absorção dos raios X é diretamente proporcional ao peso atômico da substância utilizada (Pucci, 1945; Castagnola; Orlay, 1952; Maisto, 1965; Maisto, 1975; Castagnola; Wirz, 1976). É analgésico suave, quando aplicado sobre mucosas ou feridas abertas (Bazerque, 1976). Além disso, o iodofórmio diminui a secreção de feridas (Sollman, 1957; Castagnola; Wirz, 1976), o que pode ser importante no caso de exsudatos provenientes da região apical. É, também, facilmente reabsorvido, em caso de extravasamento para o periápice (Walkhoff, 1928 apud Pucci, 1945; Castagnola; Orlay, 1952; Maisto, 1965; Iglesias et al., 1965; Muruzábal et al., 1966; Erausquin; Muruzábal, 1969; Barker; Lockett, 1971; Maisto, 1975;

Castagnola; Wirz, 1976; Guedes-Pinto et al., 1981; Rifkin, 1982; Michel, 1984; Garcia-Godoy, 1987). Alguns autores acreditam que a remoção da pasta ocorre apenas pela ação das células teciduais (Castagnola, 1950 apud Nichols, 1984), devido à fagocitose e drenagem linfática direta para os nódulos linfáticos associados (Barker; Lockett, 1971) e, principalmente, pela ação dos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Friend; Browne, 1968; Michel, 1984; Chedid, 1988).

Outro ponto muito abordado refere-se à propriedade de estimulação biológica proporcionada pelo iodoformio. Sob esse aspecto são considerados o poder irritante, a tolerância tecidual, a ação estimulante da formação de tecido de granulação cicatricial e a toxicidade. Alguns autores afirmam que pastas iodoformadas reabsorvíveis extravasadas no tecido periapical parecem retardar a formação de tecido conjuntivo e impedir a neoformação óssea ao longo de 28 dias (Bell, 1969; Erausquin; Muruzábal, 1969) e que, embora alguns pesquisadores afirmem que a pasta de iodoformio estimula os tecidos periapicais e acelera a regeneração óssea, nenhuma evidência parece apoiar isto (Nichols, 1984). Revisando a literatura pertinente encontramos, segundo a maioria dos autores, resultados contraditórios a essas afirmações: as propriedades irritantes do iodoformio estimulam a proliferação celular (Prinz; Rickert, 1941; Sollman, 1957; Pucci, 1945; Friend; Browne, 1968; Bazerque, 1976), produzindo uma reação inflamatória inicial, com necrose tecidual (Friend; Browne, 1968; Erausquin et al., 1966), atraindo células de defesa para a região, principalmente leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, que realizam a remoção do conteúdo

necrótico da região periapical (Friend; Browne, 1968; Michel, 1984; Chedid, 1988). Apesar dessa reação inflamatória, o iodofórmio atua como estimulante para o tecido de granulação inflamatório, induzindo a formação de um novo tecido de granulação, dessa vez cicatricial, bem como a neoformação óssea, favorecendo o reparo da lesão periapical e promovendo o fechamento do forame apical e ramificações do canal radicular pela deposição de cimento (Walkhoff, 1928 apud Pucci, 1945; Biolcati et al., 1942 apud Iglesias et al., 1965; Pucci, 1945; Giovacchini, 1947 apud Aydos & Milano, 1984; Hayashi, 1958; Juge, 1959; Capurro, 1964 apud Maisto, 1975; Held, 1964; Maisto, 1965; Erausquin et al., 1966; Friend; Browne, 1968; Barker; Lockett, 1971; Maisto, 1975; Bazerque, 1976; Holland et al., 1981; Michel, 1984; Chedid, 1988). Aliado a essas afirmações, observou-se freqüentes relatos quanto ao sucesso clínico obtido com tais preparações (Sturridge, 1924; Agostini, 1934; Biolcati, 1942 apud Iglesias et al., 1965; Castagnola, 1950 apud Nichols, 1984; Engel, 1950 apud Iglesias et al., 1965; Castagnola; Orlay, 1952; Iglesias et al., 1965; Guedes-Pinto et al., 1981; Rifkin, 1980 apud Rifkin, 1982; Garcia-Godoy, 1987; Thomas et al., 1994).

Por sua vez, o hidróxido de cálcio também tem sido utilizado como medicação intracanal com resultados satisfatórios. Esta substância apresenta-se como um pó branco, inodoro, obtido a partir do carbonato de cálcio. É ligeiramente solúvel em água e insolúvel em álcool (Maisto, 1975; Bazerque, 1976). Apesar das excelentes propriedades do hidróxido de cálcio, suas características físico-químicas deixam muito a desejar: radiolucidez; não possui viscosidade e aderência; permeabilidade aos fluidos bucais,

sendo rapidamente reabsorvido na região periapical e, consequentemente, solubilizado no interior do canal radicular, o que não pode ser detectado radiograficamente; pouco escoamento, dificultando sua inserção no canal radicular, necessitando a agregação de substâncias que melhorem tais propriedades (Andrade, 1973; Leonardo et al, 1976).

A composição da pasta de hidróxido de cálcio pode influenciar o seu grau de absorção, permitindo a invaginação de tecido de granulação no forame apical (Holland et al., 1979), por isso, diversos veículos têm sido propostos para sua aplicação, tais como: anestésico; água destilada; soro fisiológico; solução aquosa de metilcelulose; acetato de metacresila; telebrix. Tais substâncias são hidrossolúveis e induzem à rápida reabsorção da pasta na região periapical (Leonardo et al., 1976; Vernieks; Messer, 1978; Holland et al., 1979; Holland et al., 1979; Anthony et al., 1982; Di Fiore et al., 1983; Holland et al., 1981; Holland et al., 1983; Sahli, 1988; Souza et al., 1989; Holland et al., 1990; Leonardo et al., 1993; Lage-Marques et al., 1994; Sydney, 1996). No entanto, o polietileno glicol e o propilenoglicol, apesar de serem hidrossolúveis, têm comportamento semelhante aos óleos, produzindo uma dissociação lenta do hidróxido de cálcio, devido ao seu alto peso molecular, porém com alta concentração iônica (Leonardo et al., 1993; Lage-Marques, 1994). Outros veículos têm sido usados: paramonoclorofenol canforado, azeite de oliva, lipidiol. Tais veículos, por serem oleosos, conferem menor grau de reabsorção à pasta de hidróxido de cálcio. Por serem insolúveis em água, produzindo uma dissolução mais lenta da pasta e aumentando o tempo de permanência da mesma em contato com o tecido

pulpar ou periapical, evita-se as constantes renovações da medicação intracanal (Holland et al., 1979; Anthony et al., 1982; Di Fiore et al., 1983; Holland et al., 1983; Lopes et al., 1986; Souza et al., 1989; Lage-Marques et al., 1994).

Tem sido afirmado que quando exposto ao CO₂ do ar ou da água, o hidróxido de cálcio sofre carbonatação, inativando-o pela perda de sua ação intensamente alcalina (Maisto, 1975; Bazerque, 1976). Porém, parece que é pouco provável ocorrer tal carbonatação dentro do canal, em situação anaeróbia e com selamento adequado, visto que nas primeiras horas em que fica exposto ao ar a carbonatação é insignificante. O hidróxido de cálcio permanece ativo preservando suas propriedades anti-inflamatória, anti-exsudativa e bactericida, mesmo com um aumento de 30% no conteúdo de carbonato do pó. Ainda que o hidróxido de cálcio seja deixado em um frasco aberto por um longo período de tempo, o seu pH permanecerá o mesmo (12,5) (Cohen; Lasfargues, 1988; Fuss et al., 1996).

Para mais, este fármaco tem ação dissolvente de tecido orgânico semelhante ao hipoclorito de sódio a 0,5%, porém em menor intensidade, aumentando a eficácia clínica da limpeza e desinfecção do canal radicular se o mesmo for preenchido com tal pasta (Hasselgren et al., 1988; Wakabayashi et al., 1995).

As propriedades antibacterianas do hidróxido de cálcio têm sido atribuídas ao seu pH fortemente alcalino, que produz ação bactericida local, destruindo, por contato, as bactérias que possam ter permanecido no canal, uma vez que a vida bacteriana é incompatível com pH tão elevado

(Hermann, 1920 apud Castagnola 1956; Matsumiya; Kitamura, 1960; Fisher, 1972; Heithersay, 1975; Ferreira et al., 1978; Bystrom et al., 1985; Safavi et al., 1985; Vázquez, 1987; Haapasalo, 1989; Tronstad et al., 1990; Stuart et al., 1991). No entanto, para exercer seu efeito bactericida o hidróxido de cálcio deve permanecer no canal por período não inferior a 7 dias (Sjögren et al., 1991; Yared; Dagher, 1994) e por um período acima de 6 semanas, para que ocorra a inativação enzimáticas das bactérias anaeróbias de forma irreversível (Sydney, 1996). Porém, quando utilizado sob a forma de água de cal, lama de cal ou pasta (Pulpdent), o hidróxido de cálcio não foi tão eficaz, comparado ao paramonoclorofenol canforado (Stevens; Grossman, 1983; Di Fiore et al., 1983). Esses achados concordam com outros autores, que observaram que apenas em altas concentrações o hidróxido de cálcio teve efeito bactericida (Ferreira et al., 1978; Lage-Marques et al., 1992). Todavia, discordam dos ensaios que dizem que o hidróxido de cálcio foi mais efetivo que o paramonoclorofenol, eliminando até mesmo microrganismos anaeróbios associados a sintomas clínicos severos (Quackenbush, 1986; Ranta et al., 1988; Stuart et al., 1991; Georgopoulou et al, 1993). Ademais, verificou-se que o hidróxido de cálcio hidrolisa o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), resultando na sua degradação com liberação de ácidos graxos livre de hidróxido, podendo também alterar as propriedades biológicas do LPS, endotoxina capaz de estimular reações de defesa e inflamatórias, bem como desencadear a reabsorção óssea (Safavi; Nichols, 1993; Safavi; Nichols, 1994). Por outro lado, Byström et al. (1987) encontraram que, apesar da maioria das lesões periapicais humanas repararem após emprego

do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, alguns casos persistiram sem reparação e verificou-se que eram decorrentes do estabelecimento de infecção extra-radicular.

Outros autores aclaram que o hidróxido de cálcio controla o exsudato periapical, porque a alta concentração de íons cálcio diminui a permeabilidade capilar, reduzindo a dor pós-operatória e favorecendo o reparo (Heithersay, 1970; Heithersay, 1975; Vázquez, 1987).

Apesar do sucesso clínico apresentado pelas pastas iodoformadas e pastas de hidróxido de cálcio, poucos são os relatos de experimentos realizados *in vitro*, que levem à melhor compreensão do seu mecanismo de ação. Por essa razão, nos propusemos a desenvolver uma série de ensaios, partindo da avaliação inicial da toxicidade, *in vitro*, de tais medicações, procedimento recomendado pela FDI (1980). A este ponto, as técnicas de cultivo celular constituem valioso instrumento para observar a reação celular relacionada aos materiais dentários. O principal objetivo destas técnicas é permitir o estudo do comportamento celular em um meio controlado, livre das complexas interações do organismo. Para sua execução, a metodologia de cultura de células ou de tecidos necessita do uso de equipamentos especializados, tais como: capela de fluxo laminar; incubadoras que mantenham as condições de manutenção da viabilidade celular, com níveis adequados de umidade, temperatura e CO₂; microscópio de fase invertido, entre outros. No que se refere aos aspectos positivos, as vantagens desta metodologia são a facilidade de execução, rapidez e baixo custo operacional (Freshney, 1990).

Quando do emprego clínico de uma medicação com essas características é necessário associá-la a um veículo, para facilitar a inserção da substância no interior do canal radicular e seu escoamento para a região apical. O êxito do tratamento endodôntico pode depender tanto do medicamento ativo como do veículo empregado para a preparação da pasta, uma vez que o tempo de permanência da medicação no local de ação é determinado fundamentalmente pelo seu veículo (Lane; Blank, 1946). O polietileno glicol, na forma líquida ou sólida, tem sido utilizado por apresentar as seguintes propriedades: ser hidrossolúvel, estável, ter a capacidade de dissolver certas drogas, possuir ponto de fusão à temperatura do corpo e apresentar baixa toxicidade (Bell, 1969; Bazerque, 1976; Giro et al., 1994; Stewart; Gautieri, 1962).

A forma de preparo do material é de extrema importância ao utilizarmos metodologia *in vitro*. O ideal é preparar e testar o material exatamente na forma usada clinicamente (Spångberg; Pascon, 1988), sendo mais importante padronizar a área de superfície ativa da peça teste que entra em contato com as células, do que padronizar o peso do material usado (Kawahara et al., 1968). Mesmo assim, neste experimento padronizou-se tanto a área, utilizando-se uma lamínula de vidro de 15 mm de diâmetro, quanto o peso do material testado (0,02g). Assim sendo, tentando simular a situação clínica endodôntica, a pasta foi preparada nas proporções e consistências utilizadas e aplicada a lamínulas de vidro, de modo que as drogas entraram em contato direto com a monocamada de células confluentes. Na primeira etapa do estudo foi avaliada a resposta imediata dos

fibroblastos cultivados em contato com os veículos, carbowax e polietileno glicol 400, para determinar se haveria diferença quanto à citotoxicidade. A seguir, avaliou-se o efeito do iodofórmio e do hidróxido de cálcio, associado aos dois tipos de veículos (reação celular imediata ou de curto prazo). Na segunda etapa, procurou-se visualizar se tais substâncias poderiam interferir com o crescimento e a proliferação celular, por meio da mensuração do número de células viáveis e da porcentagem de viabilidade celular (sobrevivência celular a longo prazo). O ensaio de curta duração tentou representar o momento em que quando injetamos a substância nos tecidos periapicais lesados, a mesma entraria em contato direto com as células presentes naquela região, desencadeando uma reação tecidual à medicação. No ensaio de longa duração, o contato da lamínula contendo a substância tentou simular a situação clínica onde, uma vez introduzida a medicação com sua conseqüente reação celular inicial, verificaríamos se tais medicações poderiam interferir com a adesão e o crescimento celular, já que estas são propriedades necessárias para que ocorra o reparo (Lengheden, 1994).

No presente estudo, para calcular a porcentagem de células que permaneciam viáveis após receber a medicação, foram realizados ensaios de curta duração. Tais testes de viabilidade baseiam-se no rompimento da integridade da membrana, o que pode ser verificado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (Schmalz, 1981 apud Schmalz, 1994; Pollard, 1990; Freshney, 1990). Por sua vez, ensaios de longa duração avaliando a citotoxicidade, podem ser realizados para observar as medidas de crescimento celular e alterações na

permeabilidade da membrana celular. Assim sendo, pôde-se medir a sobrevivência a longo prazo, demonstrando também se houve a retenção ou a perda da capacidade proliferativa da célula (Mjör et al., 1985; Baserga, 1990; Freshney, 1990).

A contagem celular em hemocitômetro foi utilizada devido à facilidade de manuseio, combinada com o emprego de um corante para células não vitais, o azul de Trypan, permitindo a determinação do número de células viáveis e mortas, ou seja, o quanto uma população celular cresceu (Schmalz, 1981 apud Schmalz, 1994; Freshney, 1990; Pollard, 1990; Baserga, 1990). Não optou-se pelo uso da técnica de Guess et al (1965) apud Schmalz (1994), onde ao ocorrer dano celular há a liberação do corante por envolver avaliação subjetiva (Mjör et al., 1985). Por sua vez, não empregou-se o método do filtro Millipore e o teste do revestimento com ágar, porque intencionava-se obter o contato direto medicamento-célula. Já a metodologia de isótopos radioativos (Spångberg, 1973), para mensurar a viabilidade celular, necessita de sala e equipamentos específicos tais como, espectrômetro gama ou um contador de cintilação líquida e um sistema de distribuição de resíduos radioativos (Mjör et al., 1985; Ciapetti et al., 1996).

Por sua vez, optou-se por utilizar para o experimento fibroblastos 3T3-NIH Swiss, oriundos de embriões de camundongos, visto que o tipo de linhagem celular experimental empregada nestes testes de citotoxicidade não tem sido fator decisivo na determinação da toxicidade de um material. Os autores relatam que apesar de haver uma tendência para as células primárias serem menos sensíveis que as linhagens de células

permanentes, os principais efeitos são os mesmos, independente do tipo de linhagem celular utilizado (Spångberg, 1969b; Spångberg, 1969e; Browne; Tias, 1979; Schmalz; Saraf, 1988 apud Schmalz, 1994; Santos et al., 1996).

Os dados obtidos com as contagens celulares, permitiu a realização de gráficos representativos das curvas de viabilidades celulares, expressas em porcentagem, tanto para os ensaios de curta como os de longa duração, demonstrando a proporção entre o número de células viáveis e o número total de células em um determinado tempo. Por sua vez, os gráficos confeccionados a partir dos números de células viáveis demonstram as variações no número absoluto de células em função do tempo. Assim sendo, os dados obtidos com os experimentos foram submetidos à análise estatística através do teste de análise de variância (ANOVA), por se tratar de curvas com distribuição normal, sendo estabelecido o nível de significância de 5%. Este teste nos fornece as médias amostrais calculadas para os diferentes grupos experimentais, mas não indica quais médias são diferentes entre si. Portanto, para complementar o teste estatístico e permitir a comparação entre as diferentes médias das amostras foi realizado o teste de Tukey (GMC Basic Software, versão 7.1).

No experimento de curto prazo, quando foi avaliada a resposta imediata dos fibroblastos cultivados, nos diferentes períodos experimentais, para os grupos: controle (GI), carbowax (GII) e PEG 400 (GIII), pôde-se verificar que os veículos comportaram-se de forma semelhante, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre eles em nenhum tempo experimental. Assim sendo tanto o polietileno glicol 400 como o carbowax

são biocompatíveis *in vitro*, quando do contato imediato e após 24 horas, não causando mortalidade às células, confirmando os relatos de estudos *in vivo* e *in vitro* realizados por Stewart; Gautieri, 1962; Spångberg, 1969c; Bell, 1969.

No intuito de verificar se o tipo de veículo influenciaria a ação da medicação, comparou-se as curvas de viabilidade celular do grupo controle (GI) com os grupos onde foram utilizadas as substâncias em estudo. Quando o iodofórmio foi associado ao carbowax (GIV) ou ao PEG 400 (GV), os resultados mostraram que até o período de 12 horas não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Porém, após 24 horas do contato inicial com as substâncias, observou-se que as células responderam diminuindo a sua viabilidade; o índice de sobrevivência celular nesses experimentos apresentou diferenças estatísticas significantes entre todos os três grupos, concordando com os achados de Bae et al. (1987), Wright et al. (1994), Daniel et al. (1996) e Santos et al. (1996). Já no que se refere à toxicidade, os grupos foram classificados em ordem decrescente, da seguinte forma: GV (iodofórmio + PEG 400), GIV (iodofórmio + carbowax) e GI (controle). Por sua vez, comparando-se as viabilidades celulares dos grupos do hidróxido de cálcio associado ao carbowax (GVI), ao PEG 400 (GVII) e grupo controle (GI) verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos, em nenhum tempo experimental, mostrando que o hidróxido de cálcio associado aos diferentes veículos apresentou-se biocompatível *in vitro*, quando empregado por um período de 24 horas. Estes achados estão de acordo com Spångberg (1969e), Das (1981) e Torneck et al. (1983), sendo que outros ensaios que utilizaram metodologias e veículos

diferentes observaram ações mais tóxicas, como observa-se nos estudos realizados por Kawahara et al. (1968), Spångberg (1969b), Trostad & Wennberg (1980) e Alliot-Licht et al. (1994).

Com o objetivo de verificar se haveria diferença no efeito da medicação sobre as células quando era utilizado um mesmo tipo de veículo, comparou-se as viabilidades celulares dos diferentes grupos. Independente do veículo utilizado os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos do iodofórmio (GIV e GV) e do hidróxido de cálcio (GVI e GVII) até o período de 12 horas. No entanto, após 24 horas, houve diferença estatística significativa entre todos os grupos. Dessa maneira podemos observar que o iodofórmio, associado ao carbowax ou ao PEG 400, desenvolveu uma acentuada reação tóxica, sendo esta mais pronunciada quando o veículo era o polietileno glicol 400. Já o hidróxido de cálcio associado aos mesmos veículos comportou-se de forma semelhante entre si, não apresentando toxicidade.

Para o experimento de longo prazo foram avaliados dois parâmetros: o número de células viáveis e a viabilidade celular, em diferentes períodos experimentais. A obtenção do número de células viáveis permitiu a realização das curvas de crescimento celular, as quais nos indicaram se algum tipo de influência tóxica produzida pela medicação foi capaz de impedir a adesão e proliferação, funções estas de importância vital ao reparo de feridas (Lengheden, 1994). Por sua vez, as curvas de viabilidade celular permitiram quantificar a porcentagem de fibroblastos que permaneceram viáveis após contato com as substâncias, caracterizando,

assim, sua maior ou menor toxicidade. Nesse experimento as substâncias foram colocadas em contato direto com fibroblastos humanos aderidos, que foram semeados 4 horas antes, uma vez que para proliferar e crescer em uma superfície é necessário que as células estejam aderidas à mesma (Alliot-Licht et al., 1994).

Analisando se haveria diferença entre as curvas de crescimento e viabilidade celular entre os os grupos controles (GI e GII), carbowax (GIII) e PEG 400 (GIV), observou-se que após 1 dia não foi constatada diferença estatística significativa, mostrando que não houve interferência com a adesão celular. Todavia, nos dias 3 e 5 verificou-se que, mesmo havendo diferença estatística significativa no número de células viáveis entre os grupos, não houve diminuição da viabilidade celular. E, ao final de 7 dias, a agressividade diminuiu, sendo observada a mesma tendência apresentada no primeiro período experimental. Entretanto, é lícito salientar que, entre os dois grupos controle (GI e GII) houve diferença estatística significativa no dia 3, e que entre os dois tipos de veículos (GIII e GIV) a diferença estatística significativa só foi observada no dia 5. Desta etapa do experimento, os resultados indicaram que o grupo controle negativo (GII) e os veículos (GIII e GIV) comportaram-se de forma semelhante ao grupo controle (GI). As diferenças observadas indicam que houve um atraso na curva de crescimento celular, no terceiro dia para o controle negativo (GII) e nos períodos de 3 e 5 dias, para os veículos, devido à redução no número de células viáveis. Este fato vem demonstrar que os veículos utilizados produziram uma agressão química, enquanto a lamínula de vidro gerou uma agressão mecânica,

interferindo com a proliferação celular. No entanto, ao final de 7 dias, os fibroblastos recuperaram a sua capacidade de proliferação, mostrando que a viabilidade celular era mantida. Estes fatos encontram respaldo na literatura, pelos ensaios de Stewart; Gautieri, 1962; Spångberg, 1969; Bell, 1969. Diante desses resultados decidiu-se utilizar como grupo controle apenas o controle negativo (GII) para comparação com as substâncias testadas.

Para verificarmos se o tipo de veículo influenciaria a ação da medicação, comparou-se as curvas de crescimento e de viabilidade celular dos grupos iodofórmio associado ao carbowax (GV), ao PEG 400 (GVI) e grupo controle (GII). Os resultados mostraram que até o período de 1 dia não houve diferença estatística significativa e que tais substâncias não interferiram com a adesão celular e, também, não houve diminuição na viabilidade celular. Porém, após 3, 5 e 7 dias do contato inicial das células com as substâncias houve diferença estatística significativa no número de células viáveis entre os três grupos. A diferença estatística entre os pontos das curvas de crescimento dos grupos GV e GVI é visualizada em detalhes no gráfico da Figura 22, mostrando que o iodofórmio associado ao carbowax (GV), apesar de ser tóxico aos fibroblastos, quando comparado ao grupo controle (GII), apresentou-se menos tóxico que o grupo do iodofórmio associado ao PEG 400 (GVI), visto que até o período de 5 dias as células continuaram a proliferar, embora em pequeno número, e a viabilidade celular não diminuiu (Tabelas 5.3 e 5.5), resultados semelhantes aos obtidos por Rappaport et al. (1964), sendo que haviam outras substâncias na composição do cimento testado. No entanto, após 7 dias, ocorreu algum tipo

de reação que resultou na queda acentuada do número de células viáveis e da viabilidade celular também para o iodofórmio associado ao carbowax (GV). Ainda assim, a diferença estatística foi significativa entre os grupos GV e GVI, tanto em relação ao número de células viáveis (Tabela 5.4) como à viabilidade celular (Tabela 5.6), com menor toxicidade para o grupo do iodofórmio + carbowax (GV). Assim, pôde-se classificar, em ordem decrescente de toxicidade, os grupos GVI, GV e GII.

No que se refere ao hidróxido de cálcio associado ao carbowax (GVII) e ao PEG 400 (GVIII), verificou-se que, após 1 dia, não houve diferença estatística significativa, tanto no número de células viáveis como na viabilidade celular, demonstrando que o hidróxido de cálcio não interferiu com a adesão celular, de forma semelhante ao iodofórmio. No entanto, após 3 dias, embora a viabilidade celular tenha permanecido semelhante ao primeiro período, observou-se diferença estatística significativa no número de células viáveis entre os grupos controle (GII) e hidróxido de cálcio associado ao carbowax (GVII), mostrando que para este último o número de células aumentou consideravelmente (Tabelas 5.4 e 5.6). Este fato pode estar associado à presença traumática da lamínula, determinando a diminuição do número de células do grupo GII ou ao aumento da capacidade mitótica das células do grupo GVII, acorde relato de Torneck et al. (1983). Todavia, quando associado ao PEG 400 (GVIII) o número de células foi semelhante ao grupo controle (GII). Nos dias 5 e 7 houve diferença estatística significativa entre os grupos controle (GII) e hidróxido de cálcio associado ao PEG 400 (GVIII), com menor aumento no número de células viáveis para

este último, o qual se manteve estável após 5 dias, indicando que não houve proliferação celular, contudo, a viabilidade celular permaneceu a mesma para os três grupos (Tabelas 5.4 e 5.6). Por sua vez, quando da comparação dos grupos GVII e GVIII, observou-se a influência do veículo sobre a ação do hidróxido de cálcio, já a partir do dia 3, de onde constatou-se que o grupo do hidróxido de cálcio + carbowax (GVII) foi mais biocompatível do que o grupo do hidróxido de cálcio + PEG 400 (GVIII), pois, apesar da viabilidade celular não ter diminuído, o número de células permaneceu estável para o GVIII, enquanto continuou a proliferar para o grupo GVII, de forma semelhante ao grupo controle (GII).

As comparações realizadas entre os diferentes fármacos aplicados a um mesmo veículo, possibilitou observar que o iodofórmio (GV) e o hidróxido de cálcio (GVII) associados ao carbowax, demonstraram em suas curvas de crescimento e de viabilidade celular que, após 1 dia, não houve diferença estatística significativa. Esta característica foi mantida nos períodos de 3 e 5 dias, no que se refere à viabilidade celular, no entanto, o número de células aumentou progressivamente para o hidróxido de cálcio, ao passo que para o iodofórmio foi observado um ligeiro aumento no número de células até o dia 5, diferença essa significativa estatisticamente. No sétimo dia, tanto o número de células viáveis como a porcentagem de viabilidade celular diminuiu drasticamente para o iodofórmio associado ao carbowax (GV).

Da mesma forma, utilizando-se como veículo o PEG 400 (GVI e GVIII), constatou-se que, após 1 dia, não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos. Após 3 dias, apesar de haver manutenção

da viabilidade celular para ambos os grupos, o número de células viáveis foi significativamente maior para o hidróxido de cálcio (VIII). No entanto após 5 e 7 dias houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, mostrando que o iodofórmio foi mais tóxico do que o hidróxido de cálcio, cuja viabilidade celular permaneceu inalterada e o número de células viáveis cresceu, progressivamente, até o dia 5, mantendo-se estável após 7 dias (Tabelas 5.4 e 5.6).

Diante destes achados anteriormente discutidos, pôde-se observar que o tipo de veículo empregado, tanto nos experimentos de curto como nos de longo prazo realizados *in vitro*, influenciou a ação do hidróxido de cálcio e do iodofórmio, conferindo às associações maior ou menor toxicidade. Enquanto o hidróxido de cálcio mostrou-se biocompatível, independente do veículo empregado, o iodofórmio associado aos mesmos veículos desenvolveu uma acentuada reação tóxica e, ao final do experimento, praticamente todas as células apresentaram-se mortas. Além disso, quando as células entraram em contato direto com os veículos, quando testados isoladamente, os mesmos mostraram-se não citotóxicos, nos diferentes tempos experimentais.

Além disso, as comparações das diferenças entre as médias das porcentagens de viabilidade celular (Anexos A-3 e C-3) e do número de células viáveis (Anexo B-3), segundo a mesma medicação, nos diferentes tempos experimentais, para os experimentos de curto e longo prazo, permitiram a observação de que também o tempo foi um fator importante na determinação da citotoxicidade.

Um fato observado durante os experimentos foi que quando o iodofórmio ou o hidróxido de cálcio estava associado ao veículo cremoso (carbowax), a pasta ficava contida nos limites da lamínula, raramente se difundindo para o meio de cultura, enquanto quando o veículo empregado era o veículo líquido (PEG 400), havia uma difusão da pasta em maior intensidade. O estado físico da pasta poderia influenciar a solubilidade dos seus componentes, como ocorre com o hidróxido de cálcio, com possíveis diferenças na capacidade dos íons cálcio e hidroxila saírem das amostras produzindo diferentes níveis de alcalinidade no meio de cultura, tornando-o um meio adverso para as células cultivadas (Zmener & Cabrini, 1987), o que poderia influenciar o grau de toxicidade da substância.

O processo inflamatório crônico periapical é uma resposta ao estímulo nocivo inicialmente sediado no interior do sistema de canais radiculares e caracteriza-se, histologicamente, pela proliferação vascular, de fibroblastos e infiltrado de macrófagos e linfócitos. Essas células evocam uma resposta imune, cujo objetivo final é neutralizar, inativar ou destruir o agente agressor (antígeno ou bactéria) levando à reparação da lesão. Assim sendo, a principal causa de manutenção da cronicidade é a persistência de agentes etiológicos tais como, bactérias, produtos bacterianos, substâncias estranhas e tecido necrosado.

A fagocitose é um processo que tem como objetivo final a destruição intracelular do agente lesivo e para que tal fagocitose ocorra é necessário que haja quimiotaxia, ou seja, uma atração de células fagocitárias para o local da agressão, cuja finalidade é promover a limpeza da região

lesada. Os macrófagos contendo microrganismos intracelulares são ativados por diversas substâncias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas. Uma vez ativado o macrófago adquire propriedades, determinando as seguintes funções: remoção de células mortas, limpeza dos tecidos lesados e destruição de microrganismos, preparando o caminho para os fibroblastos e novos capilares proliferarem levando ao reparo da ferida. Como a medicação atua no sentido de acelerar esse reparo ainda não está esclarecido, principalmente no que se refere ao iodoformio. Da mesma forma que a medicação extracanal deveria promover uma anti-sepsia na região da lesão periapical, também deveria servir como auxiliar do mecanismo de defesa imunológico. Então não poderíamos colocar uma substância inerte; sua ação deveria, de alguma forma potencializar a ação das células de defesa. O iodoformio, sendo uma substância tóxica, ao entrar em contato com as células da lesão crônica, provavelmente desencadeie uma reação inflamatória local de ordem química, por um determinado tempo, porém sem a persistência irritante das bactérias, atraindo mais células de defesa para atuar sobre os microrganismos e realizar uma limpeza mais rápida da região.

Os resultados obtidos em relação à citotoxicidade das medicações intracanal *in vitro*, devem ser analisados com vista a estabelecer novas opções de tratamento na clínica endodôntica. Dessa forma, o comportamento desses medicamentos associado ao desempenho clínico e à falta de conhecimento dos seus mecanismos de ação, principalmente em relação ao iodoformio, são fatores que sugerem o desenvolvimento de novas pesquisas. Assim, resulta de interesse investigar as reações teciduais que

ocorrem quando a medicação intracanal é aplicada em casos de lesões refratárias, o que poderia contribuir com resultados importantes e poderiam sugerir novas perspectivas de tratamento. Também é de interesse pesquisar os mecanismos de liberação dos medicamentos e suas concentrações efetivas sobre os microrganismos implicados no estabelecimento da lesão periapical refratária, o que permitiria aumentar a sua efetividade e, portanto, obter melhores resultados.

7. CONCLUSÕES

1. O carbowax e o PEG 400, quando aplicados isoladamente, mostraram, nos experimentos de curto e de longo prazo, não haver diferença estatisticamente significativa entre si e em relação ao grupo controle, tanto na viabilidade celular como no número de células viáveis. Dessa forma, tais substâncias demonstraram não ser citotóxicas.

2. O iodoformio, associado a qualquer dos dois veículos, revelou ser citotóxico em ambos experimentos. Dentre as associações, a com carbowax foi menos citotóxica.

3. O hidróxido de cálcio, independentemente do veículo utilizado, demonstrou não ser citotóxico em ambos experimentos.

ANEXO A-1

Parte A - Resposta celular imediata ou de curto prazo

Teste de aderência à curva normal: Valores originais

A. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	: M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	: 0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	: 0,00	7,14	19,05	47,62	22,62	2,38	1,19

B. Cálculo do Qui quadrado:

		Interpretação
Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	: 4,95	é normal
Probabilidade de Ho	: 29,26%	

Análise de Variância (ANOVA): Valores originais

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	(F)	Prob. (Ho)
Entre colunas	5248,5596	3	1749,5199	112,47	0,00%
Entre linhas	4516,5415	6	752,7569	48,39	0,00%
Interação	11406,2324	18	633,6796	40,74	0,00%
Resíduo	871,1040	56	15,5554		
Variação total	22042,4375	83			

* Colunas = Tempo (4); Linhas = Medicação (7)

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Medicação x Tempo
Valor do resíduo na análise de variância	15,55540
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	84
Número de médias comparadas	28
Número de dados usados para cada média	3
Graus de liberdade do resíduo	56
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 28 médias e 56 graus de liberdade	5,536
Valor crítico do Tukey calculado	12,60596

ANEXO A-2

Parte A - Resposta celular imediata ou de curto prazo

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Tempo
Valor do resíduo na análise de variância	15,55540
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	84
Número de médias comparadas	4
Número de dados usados para cada média	21
Graus de liberdade do resíduo	56
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 4 médias e 56 graus de liberdade	3,750
Valor crítico do Tukey calculado	3,22747

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Medicação
Valor do resíduo na análise de variância	15,55540
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	84
Número de médias comparadas	7
Número de dados usados para cada média	12
Graus de liberdade do resíduo	56
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 4 médias e 56 graus de liberdade	4,456
Valor crítico do Tukey calculado	5,07335

ANEXO A-3

Tabela - Comparação das diferenças entre as médias das viabilidades celulares (%) para o fator interação: medicação x tempo, segundo a mesma medicação nos diferentes períodos experimentais, para o experimento de curto prazo, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 12,60596

Grupos	Grupo x Período	Diferença entre médias	$\alpha = 5\%$
GI	GI0 x GI6	0,504	ns
	GI0 x GI12	0,014	ns
	GI0 x GI24	1,039	ns
	GI6 x GI12	0,490	ns
	GI6 X GI24	1,543	ns
	GI12 X GI24	1,053	ns
GII	GII0 x GII6	0,329	ns
	GII0 x GII12	1,278	ns
	GII0 x GII24	9,271	ns
	GII6 x GII12	1,607	ns
	GII6 X GII24	9,600	ns
	GII12 X GII24	7,993	ns
GIII	GIII0 x GIII6	1,557	ns
	GIII0 x GIII12	3,075	ns
	GIII0 x GIII24	4,098	ns
	GIII6 x GIII12	1,518	ns
	GIII6 X GIII24	2,541	ns
	GIII12 X GIII24	1,023	ns
GIV	GIV0 x GIV6	3,308	ns
	GIV0 x GIV12	3,739	ns
	GIV0 x GIV24	52,299	s
	GIV6 x GIV12	0,431	ns
	GIV6 X GIV24	48,991	s
	GIV12 X GIV24	48,560	s
GV	GV0 x GV6	1,146	ns
	GV0 x GV12	7,248	ns
	GV0 x GV24	71,649	s
	GV6 x GV12	6,102	ns
	GV6 X GV24	70,503	s
	GV12 X GV24	64,401	s
GVI	GVI0 x GVI6	0,125	ns
	GVI0 x GVI12	1,414	ns
	GVI0 x GVI24	1,678	ns
	GVI6 x GVI12	1,289	ns
	GVI6 X GVI24	1,553	ns
	GVI12 X GVI24	0,264	ns
GVII	GVII0 x GVII6	2,587	ns
	GVII0 x GVII12	0,990	ns
	GVII0 x GVII24	2,114	ns
	GVII6 x GVII12	1,597	ns
	GVII6 X GVII24	4,701	ns
	GVII12 X GVII24	3,104	ns

ns - significante

s - significante

ANEXO B-1

Parte B - Sobrevivência a longo prazo
Número de Células Viáveis ($\times 10^4$)

Teste de aderência à curva normal: Valores originais

A. Freqüências por intervalos de classe:

<u>Intervalos de classe</u>	<u>M-3s</u>	<u>M-2s</u>	<u>M-1s</u>	<u>Med.</u>	<u>M+1s</u>	<u>M+2s</u>	<u>M+3s</u>
Curva normal	: 0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	: 1,04	3,13	9,38	69,79	12,50	1,04	2,08

B. Cálculo do Qui quadrado:**Interpretação**

Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	: 41,63	não é normal
Probabilidade de Ho	: 0,0000%	

Teste de aderência à curva normal: Logaritmos (dados + 1)

A. Freqüências por intervalos de classe:

<u>Intervalos de classe</u>	<u>M-3s</u>	<u>M-2s</u>	<u>M-1s</u>	<u>Med.</u>	<u>M+1s</u>	<u>M+2s</u>	<u>M+3s</u>
Curva normal	: 0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	: 1,04	6,25	19,79	46,88	21,88	3,13	1,04

B. Cálculo do Qui quadrado:**Interpretação**

Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	: 3,34	é normal
Probabilidade de Ho	: 50,23%	

Análise de Variância (ANOVA): Logaritmos (dados + 1)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	(F)	Prob. (Ho)
Entre colunas	8,4813	3	2,8271	1650,37	0,00%
Entre linhas	8,7359	7	1,2480	728,54	0,00%
Interação	4,9212	21	0,2343	136,80	0,00%
Resíduo	0,1096	64	0,0017		
Variação total	22,2480	95			

* Colunas = Tempo (4); Linhas = Medicação (8)

ANEXO B-2

**Parte B - Sobrevivência a longo prazo-
Número de Células Viáveis ($\times 10^4$)**

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Medicação x Tempo
Valor do resíduo na análise de variância	0,00170
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	32
Número de dados usados para cada média	3
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 32 médias e 64 graus de liberdade	5,611
Valor crítico do Tukey calculado	0,13356

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Tempo
Valor do resíduo na análise de variância	0,00170
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	4
Número de dados usados para cada média	24
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 4 médias e 64 graus de liberdade	3,737
Valor crítico do Tukey calculado	0,03145

Cálculo do valor crítico de Tukey	Fator de Variação Medicação
Valor do resíduo na análise de variância	0,00170
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	8
Número de dados usados para cada média	12
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 8 médias e 64 graus de liberdade	4,435
Valor crítico do Tukey calculado	0,05278

ANEXO B-3

Tabela - Comparação das diferenças entre as médias dos números de células viáveis ($\times 10^4$) para o fator interação: medicação x tempo, segundo a mesma medicação nos diferentes períodos experimentais, para o experimento de longo prazo, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 0,13356.

Grupos	Grupo x Período	Diferença entre médias	$\alpha = 0,05$
GI	GI1 x GI3	0,666	s
	GI1 x GI5	0,972	s
	GI1 x GI7	1,154	s
	GI3 X GI5	0,306	s
	GI3 X GI7	0,488	s
	GI5 X GI7	0,182	s
GII	GII1 x GII3	0,467	s
	GII1 x GII5	0,909	s
	GII1 x GII7	1,183	s
	GII3 X GII5	0,442	s
	GII3 X GII7	0,716	s
	GII5 X GII7	0,274	s
GIII	GIII1 X GIII3	0,451	s
	GIII1 x GIII5	0,829	s
	GIII1 x GIII7	1,185	s
	GIII3 X GIII5	0,378	s
	GIII3 X GIII7	0,734	s
	GIII5 X GIII7	0,356	s
GIV	GIV1 x GIV3	0,466	s
	GIV1 x GIV5	0,966	s
	GIV1 x GIV7	1,195	s
	GIV3 X GIV5	0,500	s
	GIV3 X GIV7	0,729	s
	GIV5 X GIV7	0,229	s
GV	GV1 x GV3	0,072	ns
	GV1 x GV5	0,145	s
	GV1 x GV7	0,191	s
	GV3 X GV5	0,073	ns
	GV3 X GV7	0,263	s
	GV5 X GV7	0,336	s
GVI	GVI1 x GVI3	0,045	ns
	GVI1 x GVI5	0,254	s
	GVI1 x GVI7	0,266	s
	GVI3 X GVI5	0,229	s
	GVI3 X GVI7	0,221	s
	GVI5 X GVI7	0,012	ns
GVII	GVII1 x GVII3	0,646	s
	GVII1 x GVII5	0,931	s
	GVII1 x GVII7	1,114	s
	GVII3 X GVII5	0,256	s
	GVII3 X GVII7	0,439	s
	GVII5 X GVII7	0,183	s
GVIII	GVII1 x GVII3	0,502	s
	GVII1 x GVII5	0,832	s
	GVII1 x GVII7	0,832	s
	GVII3 X GVII5	0,330	s
	GVII3 X GVII7	0,330	s
	GVII5 X GVII7	0,000	ns

ns - não significante

s - significante

ANEXO C-1

**Parte C - Sobrevivência a longo prazo
Viabilidade Celular (%)**

Teste de aderência à curva normal: Valores originais

A. Freqüências por intervalos de classe:

<u>Intervalos de classe</u>	<u>M-3s</u>	<u>M-2s</u>	<u>M-1s</u>	<u>Med.</u>	<u>M+1s</u>	<u>M+2s</u>	<u>M+3s</u>
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	1,04	3,13	20,83	48,96	16,67	7,29	2,08

B. Cálculo do Qui quadrado:

	<u>Interpretação</u>
Graus de liberdade : 4	A distribuição amostral testada é normal
Valor do Qui quadrado : 6,50	
Probabilidade de Ho : 16,50%	

Análise de Variância (ANOVA): Valores originais

<u>Fonte de Variação</u>	<u>Soma de Quadrados</u>	<u>Graus de Liberdade</u>	<u>Quadrados Médios</u>	<u>(F)</u>	<u>Prob. (Ho)</u>
Entre colunas	5851,0625	3	1950,3541	94,79	0,00%
Entre linhas	18582,1035	7	2654,5862	129,02	0,00%
Interação	24050,7305	21	1145,2728	55,66	0,00%
Resíduo	1316,7910	64	20,5749		
Variação total	49800,6875	95			

<u>Cálculo do valor crítico de Tukey</u>	<u>Fator de Variação Medicação x Tempo</u>
Valor do resíduo na análise de variância	20,57490
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	32
Número de dados usados para cada média	3
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 32 médias e 64 graus de liberdade	5,611
Valor crítico do Tukey calculado	14,69341

* Colunas = Tempo (4); Linhas = Medicação (8)

ANEXO C-2

**Parte C - Sobrevida a longo prazo
Viabilidade Celular (%)**

Cálculo do valor crítico de Tukey	Tempo
Valor do resíduo na análise de variância	20,57490
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	4
Número de dados usados para cada média	24
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 4 médias e 64 graus de liberdade	3,737
Valor crítico do Tukey calculado	3,45977

Cálculo do valor crítico de Tukey	Medicação
Valor do resíduo na análise de variância	20,57490
Nível de probabilidade desejado	5
Número total de dados(da amostra)	96
Número de médias comparadas	8
Número de dados usados para cada média	12
Graus de liberdade do resíduo	64
Valor de q tabelado, ao nível de 5% para 8 médias e 64 graus de liberdade	4,435
Valor crítico do Tukey calculado	5,80683

ANEXO C-3

Tabela - Comparação das diferenças entre as médias das viabilidades celulares (%) para a interação: medicação x tempo, segundo a mesma medicação nos diferentes tempos, para o experimento de longo prazo, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $P_{5\%}$ - Valor crítico de Tukey = 14,69341

Grupos	Grupo x Período	Diferença entre médias	$\alpha = 0,05$
GI	GI1 x GI3	2,895	ns
	GI1 x GI5	0,101	ns
	GI1 x GI7	0,426	ns
	GI3 X GI5	2,794	ns
	GI3 X GI7	0,426	ns
	GI5 X GI7	0,527	ns
GII	GII1 x GII3	6,478	ns
	GII1 x GII5	0,385	ns
	GII1 x GII7	1,681	ns
	GII3 X GII5	6,863	ns
	GII3 X GII7	4,797	ns
	GII5 X GII7	2,066	ns
GIII	GIII1 X GIII3	1,697	ns
	GIII1 x GIII5	1,684	ns
	GIII1 x GIII7	3,252	ns
	GIII3 X GIII5	3,381	ns
	GIII3 X GIII7	3,252	ns
	GIII5 X GIII7	4,936	ns
GIV	GIV1 x GIV3	3,980	ns
	GIV1 x GIV5	4,978	ns
	GIV1 x GIV7	4,204	ns
	GIV3 X GIV5	8,958	ns
	GIV3 X GIV7	8,184	ns
	GIV5 X GIV7	0,774	ns
GV	GV1 x GV3	5,951	ns
	GV1 x GV5	5,956	ns
	GV1 x GV7	64,605	s
	GV3 X GV5	1,995	ns
	GV3 X GV7	58,654	s
	GV5 X GV7	60,649	s
GVI	GVI1 x GVI3	9,680	ns
	GVI1 x GVI5	84,945	s
	GVI1 x GVI7	90,470	s
	GVI3 X GVI5	75,265	s
	GVI3 X GVI7	80,798	s
	GVI5 X GVI7	5,533	ns
GVII	GVII1 x GVII3	6,156	ns
	GVII1 x GVII5	3,727	ns
	GVII1 x GVII7	5,409	ns
	GVII3 X GVII5	2,429	ns
	GVII3 X GVII7	0,747	ns
	GVII5 X GVII7	1,682	ns
GVIII	GVIII1 x GVIII3	8,315	ns
	GVIII1 x GVIII5	7,927	ns
	GVIII1 x GVIII7	11,811	ns
	GVIII3 X GVIII5	3,388	ns
	GVIII3 X GVIII7	11,811	ns
	GVIII5 X GVIII7	6,884	ns

ns - não significante

s - significante

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AGOSTINI, E. The therapeutic value of iodoform. **Dent Items Interest**, v. 56, n. 10, p. 820-821, Oct. 1934.
2. 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**, v. 39, n. 6, p. 481-489, June 1994.
3. ANDRADE, S. Hidróxido de cálcio - problema de radiopacidade. **Rev Bras Odontol**, v. 30, n. 183, p. 187-189, set./out. 1973.
4. ANDREASEN, J. O.; RUD, J. A histobacteriologic study of dental and periapical structures after endodontic surgery. **Int J Oral Surg**, v. 1, n. 5, p. 272-281, May 1972.

* De acordo com NBR- 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1989.
Abreviatura de periódicos segundo "Index to Dental Literature"

5. ANTHONY, D. R.; GORDON, T. M.; DEL RIO, C. E. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 54, n. 5, p. 560-565, Nov. 1982.
6. AYDOS, J. H.; MILANO, N. F. Revisão bibliográfica sobre o uso do iodofórmio em endodontia. **Rev Fac Odontol Porto Alegre**, v. 26, p. 43-51, mar. 1984.
7. BAE, R. D.; WATANABE, E.; TSUJIHAMA, M.; MAMADA, A.; HOJO, K.; TAKAHASHI, T.; MORIYAMA, K.; SAITO, R.; TSUTSUI, T. Cytotoxicity of iodoform on culture mammalian cells. **Shigaku**, v. 75, n. 5, p. 997-1004, 1987.
8. BARKER, B. C. W.; LOCKETT, B. C. Endodontic experiments with resorbable paste. **Aust Dent J**, v. 16, n. 6, p. 364-372, Dec. 1971.
9. BASERGA, R. **Cell growth and division - a practical approach**. Philadelphia: IRL Press, 1990. p. 1-16.
10. BAZERQUE, P. **Farmacologia odontológica**. 2.ed. Buenos Aires: Mundi, 1976. 879p.
11. BELL, J. W. Kri 1 paste. **N Z Dent J**, v. 65, n. 300, p. 96-106, Apr. 1969.
12. BOYLE, P. E. Intracellular bacteria in a dental granuloma. **J Dent Res**, v. 14, n. 4, p. 297-301, Aug. 1934.

13. BROWNE, R.; TIAS, M, J. Biological testing of dental restorative materials *in vitro* - a review. **J Oral Rehab**, v. 6, n. 4, p. 365-374, Oct. 1979.
14. BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v. 1, n. 5, p. 170-175, Oct. 1985.
15. BYSTRÖM, A.; HAPPONEN, R-P.; SJÖGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 2, p. 58-63, Apr. 1987.
16. CAMARGO, R. O emprego do iodoformio em odontologia. **Rev Bras Odontol**, v. 2, n. 8, p. 96-97, fev. 1926.
17. CASTAGNOLA, L.; ORLAY, H. G. Treatment of gangrene of the pulp by the Walkhoff method. **Br Dent J**, v. 93, n. 4, p. 93-102, Aug. 1952.
18. CASTAGNOLA, L. **La conservación de la vitalidad de la pulpa en la operatoria dental**. Buenos Aires: Mundi, 1956. 156p.
19. CASTAGNOLA, W.; WIRZ, J. The use of iodoform paste (Walkhoff method) in modern endodontic therapy. **Quintessence Int Dent Technol**, v. 7, n. 4, p. 19-23, Apr. 1976.
20. CHEDID, R. R. **Estudo histopatológico da reação da polpa de ratos submetidos à ação de pastas e medicamentos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos**. São Paulo, 1988. 72p. Dissertação(Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo.

21. CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1259-1264, July 1996.
22. COHEN, F.; LASFARGUES, J.-J. Quantitative chemical study of root canal preparations with calcium hydroxide. **Endod Dent Traumatol**, v. 4, n. 3, p. 108-113, June 1988.
23. ÇALLŞKAN, M. K.; PIŞKIN, B. Internal resorption occurring after accidental extrusion of iodoform paste into the mandibular canal. **Endod Dent Traumatol**, v. 9, n. 2, p. 81-84, Oct. 1993.
24. DANIEL, R. L. D.; JAEGER, M. M. M.; MACHADO, M. E. L. Estudo do comportamento biológico do iodofórmio em culturas de fibroblastos. **RPG**, v. 3, n. 4, p. 291, out./nov./dez. 1996.
25. DAS, S. Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 52, n. 1, p. 76-84, July 1981.
26. DE TERRA, P. Salubrol, a substitute for iodoform. **Int Dent J**, v. 17, n. 9, p. 566-572, Sept. 1896.
27. DiFIORE, P. M.; PETERS, D. D.; SETTERSTROM, J. A.; LORTON, L. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 55, n. 1, p. 91-94, Jan. 1983.
28. EISKJAER, M.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Cytotoxicity of formaldehyde of three different human cell types. **J Dent Res**, v. 73, n. 4, p. 952, Apr. 1994.

29. ERAUSQUIN, J.; MURUZÁBAL, M. Tissue reaction to root canal fillings with absorbable pastes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 28, n. 4, p. 567-578, Oct. 1969.
30. ERAUSQUIN, J.; MURUZÁBAL, M.; DEVOTO, F. C. H.; RIKLES, A. Necrosis of the periodontal ligament in root canal overfillings. **J Dent Res**, v. 45, n. 4, p. 1084-1092, July/Aug. 1966.
31. FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int Dent J**, v. 30, n. 2, p. 140-188, June 1980.
32. FERREIRA, A. C. S.; ALMEIDA, D.; FONSECA, G. A. Avaliação do poder bacteriostático e bactericida do hidróxido de cálcio utilizado como curativo de demora nos canais radiculares. **Rev Bras Odontol**, v. 35, n.2, p. 15-21, mar./abr. 1978.
33. FISHER, F.J. The effect of a calcium hydroxide/water paste on micro-organisms in carious dentine. **Br Dent J**, v. 133, n. 1, p. 19-21, July 1972.
34. FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**. A manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. 397p.
35. FRIEND, L. A.; BROWNE, R. M. Tissue reaction to some root filling materials. **Brit Dent J**, v. 125, n. 7, p. 291-298, Oct. 1968.
36. FUSS, Z.; RAFAELOFF, R.; TAGGER, M.; SZAJKIS, S. Intracanal pH changes of calcium hydroxide pastes exposed to carbon dioxide in vitro. **J Endod**, v. 22, n. 7, p. 362-364, July 1996.
37. GARCIA-GODOY, F. Evaluation of an iodoform paste in root canal therapy for infected primary teeth. **J Dent Child**, v. 54, n. 1, p. 30-34, Jan./Feb. 1987.

38. GIRO, E. M. A.; IOST, H. I.; LIA, R. C. C. Análise histopatológica comparativa em polpa de dentes de cães, após pulpotomia e utilização de pastas à base de hidróxido de cálcio em diferentes veículos. **Rev Odontol Unesp**, v. 23, n. 2, p. 191-201, jul./dez. 1994.
39. GEORGOPOULOU, M.; KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M. *In vitro* evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. **Endod Dent Traumatol**, v. 9, n. 6, p. 249-253, Dec. 1993.
40. GUEDES-PINTO, A.; PAIVA, J. G.; BOZZOLA, J. R. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v. 35, n. 3, p. 240-245, maio/jun. 1981.
41. HAAPASALO, M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. **Endod Dent Traumatol**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Feb. 1989.
42. HANKS, C. T.; BERGENHOLTZ, G.; KIM, J. S. Protein synthesis *in vitro* in the presence of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - containing pulp-capping medicament. **J Oral Pathol**, v. 12, n. 5, p. 356-365, Oct. 1983.
43. HASSELGREN, G.; OLSSON, B.; CVEK, M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. **J Endod**, v. 14, n. 3, p. 125-127, Mar. 1988.
44. HAYASHI, M. Supplementary experimental study treatment of infected root canal of deciduous teeth. **Bull Oral Path Tokyo D Coll**, v. 3, n. 1, p. 1-4, Nov. 1958.
45. HEITHERSAY, G. S. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. **J Br Endod Soc**, v. 8, n. 2, p. 74-93, July 1975.

46. HEITHERSAY, G. S. Periapical repair following conservative endodontic therapy. **Aust Dent J**, v. 15, n. 6, p. 511-518, Dec. 1970.
47. HELD, A. L'iodoforme doit-il être abandonné? **Schweiz Mscht**, v. 74, n. 8, p. 715-735, Aug. 1964.
48. HOLAN, G.; FUKS, A. B. A comparison of pulpectomies using ZOE and KRI paste in primary molars: a retrospective study. **Pediatr Dent**, v. 15, n. 6, p. 403-407, Nov./Dec. 1993.
49. HOLLAND, R.; MAISTO, O. A.; SOUZA, V.; MARESCA, B. M.; NERY, M. J. Acción y velocidad de reabsorción de distintos materiales de obturación de conductos radiculares en el tejido conectivo periapical. **Rev Asoc Odontol Argentina**, v. 69, n. 1, p. 7-17, ene./feb. 1981.
50. HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M. J.; MELLO, W.; BERNABÉ, P. F. E. Root canal treatment with calcium hydroxide effect of an oily or a water soluble vehicle. **Rev Odontol Unesp**, v. 12, n. 1/2, p. 1-6, 1983.
51. HOLLAND, R.; MELLO, W.; SOUZA, V.; NERY, M.; BERNABÉ, P. F. E.; OTOBONI FILHO, J. A. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães após a obturação de canal com sealapex acrescido ou não de iodofórmio. **Rev Odontol Unesp**, v. 19, n. 1, p. 97-104, 1990.
52. HOLLAND, R.; NERY, M. J.; MELLO, W.; SOUZA, V.; BERNABÉ, P. F. E.; OTOBONI FILHO, J. A. Root canal treatment with calcium hydroxide. II Effect of instrumentation beyond the apices. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 47, n. 1, p. 93-96, Jan. 1979.

53. HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M. J.; MELLO, W.; BERNABÉ, P.F.E.; OTOBONI FILHO, J. A. A histological study of the effect of calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth of dogs. **J Br Endod Soc**, v. 12, n.1, p. 15-23, 1979.
54. IGLESIAS, N. N.; RAJCOVICH, J.; SOLINAS, A. C. La reparación periapical posterior al tratamiento de conductos radiculares infectados. **Rev Asoc Odontol Argentina**, v. 53, n. 2, p. 35-42, feb. 1965.
55. IWU, C.; MacFARLANE, T. W.; MacKENZIE, D.; STENHOUSE, D. The microbiology of periapical granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 69, n. 4, p. 502-505, Apr. 1990.
56. JUGE, H. Resorbable pastes for root canal fillings. **Int Dent J**, v. 9, n. 4, p. 461-476, Dec. 1959.
57. KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA Jr., M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. **Int Dent J**, v. 18, n. 2, p. 443-467, June 1968.
58. LAGE-MARQUES, J. L.; CONTI, R.; ANTONIAZZI, J. H.; GUTZ, I. Avaliação da velocidade de dissociação iônica do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos. **Rev Odont Univ São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 81-87, abr./jun. 1994.
59. LAGE-MARQUES, J. L.; MAYER, M. P. A.; SIMÕES, W.; CONTI, R. Análise da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio P.A. sobre algumas espécies de microrganismos. Contribuição ao estudo. **Rev Fac Odontol FZL**, v. 4, n. 2, p. 75-80, jul./dez. 1992.
60. LANE, C. G.; BLANK, I. H. Vehicles in topical dermatologic therapy - their functions and physicochemical characteristics. **Arch Derm Syph**, v. 54, n. 5, p. 497-513, Nov. 1946.

61. LEIRSKAR, J.; HELGELAND, K. Mechanism of toxicity of dental materials. *Int Endod J*, v. 14, n.1, p. 42-48, Jan. 1981.
62. LENGHEDEN, A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts *in vitro*. *Scand J Dent Res*, v. 102, n. 2, p. 130-136, Apr. 1994.
63. LEONARDO, M. R.; ARAÚJO, C. H.; MENDES, A. J. D. Contribuição para o emprego de pastas à base de hidróxido de cálcio na obturação de canais radiculares. Estudo de propriedades físicas, químicas e biológicas . Parte I. *Rev Fac Farm Odontol Araraquara*, v. 10, n.1, p. 125-135, 1976. Suplemento.
64. LEONARDO, M. R. L.; SILVA, L. A. B.; LEONARDO, R. T.; UTRILLA, L. S.; ASSED, S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod*, v. 19, n. 7, p. 348-352, July 1993.
65. LITTER, M. *Farmacologia*. 3.ed. Buenos Aires: Ateneo, 1964. p.1093-1095.
66. LOPES, H. P.; COSTA FILHO, A. S.; JONES Jr., J. O emprego do hidróxido de cálcio associado ao azeite de oliva. *RGO (Porto Alegre)*, v. 34, n. 4, p. 306-313, jul./ago. 1986.
67. MAISTO, O. A. Preparacion y empleo de la pasta lentamente reabsorbible para obturar conductos radiculares. *Rev Asoc Odontol Argentina*, v. 53, n. 3, p. 88-89, mar. 1965.
68. MAISTO, O. A. *Endodoncia*. 3.ed. Buenos Aires: Mundi, 1975. 407p.
69. MAISTO, O. A.; ERAUSQUIN, J. Reacción de los tejidos periapicales del molar de la rata a las pastas de obturación, reabsorbibles. *Rev Asoc Odontol Argentina*, v. 53, n. 1, p. 12-20, ene. 1965.

70. MATSUMIYA, S.; KITAMURA, M. Histo-pathological and histo-bacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 1, n.1, p. 1-19, Oct. 1960.
71. MICHEL, J. A. **Estudo histopatológico da reação do subcutâneo de camundongos submetidos à ação de pasta obturadora utilizada na terapia endodôntica de dentes decíduos com polpa mortificada**. São Paulo, 1984. 53p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
72. MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent Cosmos**, v. 36, n. 7, p. 505-528, July 1894.
73. MJÖR, I. A.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; ØRSTAVIK, D. Biological properties. In: MJÖR, I. A. **Dental materials: biological properties and clinical evaluations**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 21-68.
74. MÖLLER, A. J.; FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; ÖHMAN, A. E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissue of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 475-484, Dec. 1981.
75. MOLVEN, O.; OLSEN, I.; KERÉKES, K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v. 7, n. 5, p. 226-229, Oct. 1991.
76. MURUZÁBAL, M.; ERAUSQUIN, J.; DEVOTO, F. C. H. A study of periapical overfilling in root canal treatment in the molar of rat. **Arch Oral Biol**, v. 11, n. 4, p. 373-383, Apr. 1966.

77. NICHOLLS, E. **Endodontics**. 3.ed. Bristol: Wright, 1984. Cap. 15. p. 321-331.
78. PAIVA, J. G.; ANTONIAZZI, J. H. **Endodontia**: bases para a prática clínica. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993. 886p.
79. POLLARD, J. W. Basic cell culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. **Methods in molecular biology**: animal cell culture. New Jersey: Humana Press, 1990. v. 5. p.1-12.
80. PRINZ, ; RICKERT, U. G. **Pharmacology and dental therapeutics**. 8.ed. St. Louis: Mosby, 1941. 507p.
81. PUCCI, F. M. **Conductos radiculares**: anatomia, patologia y terapia. Buenos Aires: Médico Quirúrgica, 1945. v. 2, p. 343-395.
82. QUACKENBUSH, L. *In vitro* testing of 3 types of endodontic medicaments against anaerobic bacteria. **J Endod**, v. 12, n. 3, p. 132, Mar. 1986.
83. RAMACHANDRAN NAIR, P. N. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J Endod**, v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan. 1987.
84. RAMACHANDRAN NAIR, P. N.; SJÖGREN, U.; GUNTHILD KREY, K.E.K.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**, v. 16, n. 12, p. 580-588, Dec. 1990.
85. RANTA, K.; HAAPASALO, M.; RANTA, H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. **Endod Dent Traumatol**, v. 4, n. 6, p. 269-272, Dec. 1988.

86. RAPPAPORT, H. M.; LILLY, G. E.; KAPSIMALIS, P. Toxicity of endodontic filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 18, n. 6, p. 785-802, Dec. 1964.
87. READER, C. M.; BONIFACE, M.; BUJANDA-WAGNER, S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. **J Endod**, v. 20, n. 12, p. 607-609, Dec. 1994.
88. RIFKIN, A. The root canal treatment of abscessed primary teeth - a three to four year follow-up. **J Dent Child**, v. 49, n. 6, p. 428-431, Nov./Dec. 1982.
89. SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, v. 20, n. 3, p. 127-129, Mar. 1994.
90. SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, v. 19, n. 2, p. 76-78, Feb. 1993.
91. SAFAVI, K. E.; DOWDEN, W. E.; INTROCASO, J. H.; LANGELAND, K. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. **J Endod**, v. 11, n. 10, p. 454-456, Oct. 1985.
92. SAHLI, C. C. l'hydroxyde de calcium dans le traitement endodontique des grandes lesions périapicales. **Rev Fr Endod**, v. 7, n. 2, p. 45-51, juin 1988.
93. SANTOS, E.; JAEGER, M. M. M.; PINTO, A. C. G. Estudo *in vitro* da pasta Guedes-Pinto em fibroblastos embrionários e pulpares. **RPG**, v. 3, n. 4, p. 297, out./nov./dez. 1996.

94. SARRAZIN, M. J. H. Iodoform. **Dent Items Interest**, v. 56, n. , p. 10-14, mês 1924.
95. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. **J Dent**, v. 22, n.2, p.S6-S11, Aug. 1994. Suplemento.
96. SEMERARO, D.; MAGALHÃES, T. R. Iodofórmio - um medicamento poderoso. **Rev Farm Odontol**, v. 44, n. 446, p. 445-447, jul. 1978.
97. SJÖGREN, V.; FIGDOR, D.; SPÅNGBERG, L.; SUNDQVIST, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J**, v. 24, n. 3, p. 119-125, May 1991.
98. SOLLMANN, T. H. **A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology**. 8.ed. Philadelphia: Saunders, 1957. 1535p.
99. SOUZA, V.; BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R.; NERY, M. J.; MELLO, W.; OTOBONI FILHO, J. A. Tratamento não-cirúrgico de dentes com lesões periapicais. **Rev Bras Odontol**, v. 56, n. 2, p. 39-46, mar./abr. 1989.
100. SPÅNGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water-soluble substances on human cells *in vitro*. **Odontol Revy**, v. 20, n. 2, p. 123-132, 1969a.
101. SPÅNGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 2. Effect *in vitro* of water-soluble components of root canal filling material on HeLa cells. **Odontol Revy**, v. 20, n. 2, p. 133-145, 1969b.

102. SPÅNGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 3. Effect of Tween 80[®] on human cells *in vitro*. **Odontol Revy**, v. 20, n. 3, p. 283-299, 1969c.
103. SPÅNGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 4. Effect of *in vitro* of solubilised root canal filling materials on HeLa cells. **Odontol Revy**, v. 20, n. 2, p. 289-299, 1969d.
104. SPÅNGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 5. Toxic effect *in vitro* of root canal filling materials on HeLa cells and human skin fibroblasts. **Odontol Revy**, v. 20, n. 4, p. 427-436, 1969e.
105. SPÅNGBERG, L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 35, n. 3, p. 389-401, Mar. 1973.
106. SPÅNGBERG, L.; PASCON, E. A. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. **J Endod**, v. 14, n. 5, p. 247-250, May 1988.
107. STEVENS, R. H.; GROSSMAN, L. I. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. **J Endod**, v. 9, n. 9, p. 372-374, Sept. 1983.
108. STEWART, G. G.; GAUTIERI, R. F. Medicamentos de reducido poder inflamatorio, sometidos a la prueba del tiempo, en terapéutica de conductos. **Rev Asoc Odontol Argentina**, v. 50, n. 2, p. 82-87, Feb. 1962.
109. STUART, K. G.; MILLER, C. H.; BROWN Jr., C. E.; NEWTON, C. W. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 72, n. 1, p. 101-104, July 1991.

110. STURRIDGE, E. Iodoform in root canal work. **Dent Items Interest**, v. 56, n. 9, p. 14-17, 1924.
111. SYDNEY, G. B. **Identificação de bactérias anaeróbias após o preparo do canal radicular com emprego de medicação de hidróxido de cálcio em diferentes tempos**. São Paulo, 1996. 147p. Tese(Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo.
112. THOMS, H. **Química aplicada a la Farmácia**. Barcelona: Labor, 1930. p. 309-310.
113. THOMAS, A. M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S.; PANDEY, R. K. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. **J Endod**, v. 20, n. 5, p. 233-235, May 1994.
114. TORNECK, C. D.; MOE, H.; HOWLEY, P. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts *in vitro*. **J Endod**, v. 9, n. 4, p. 131-136, Apr. 1983.
115. TRONSTAD, L.; WENNERBERG, A. *In vitro* assessment of the toxicity of filling materials. **Int Endod J**, v. 13, n. 3, p. 131-138, Sept. 1980.
116. TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontic infections. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 2, p. 86-90, Apr. 1987.
117. TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 2, p. 73-77, Apr. 1990a.

118. TRONSTAD, L.; KRESHTOOL, D.; BARNETT, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 6, p. 129-136, June 1990b.
119. VAZQUEZ, J. M. F. Hidroxido de calcio como material dental. **Rev Actual Estomatol Esp**, v. 47, n. 367, p. 61-66, Set. 1987.
120. VELÁZQUEZ, B.L. **Terapéutica con sus fundamentos de farmacología experimental**. 10.ed. Barcelona: Científica, 1955. v.1. p. 132-134.
121. VERNIEKS, A. A.; MESSER, L. B. Calcium hydroxide induced healing of periapical lesions: a study of 78 non-vital teeth. **J Brit Endod Soc**, v. 11, n. 2, p. 61-69, July 1978.
122. VOJINOVIĆ, O.; SRNIĆ, E. Induction of apical formation by the use of calcium hydroxide and iodoform-Chlumsky paste in the endodontic treatment of immature teeth. **J Br Endod Soc**, v. 8, n. 1, p. 16-22, Jan. 1975.
123. WAKABAYASHI, H.; ISHIGURO, M.; FUNATO, A.; NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Evaluation of calcium hydroxide-containing root canal sealers with an improved rabbit ear chamber. **Endod Dent Traumatol**, v. 10, n. 5, p. 239-246, May 1994.
124. WAKABAYASHI, H.; MORITA, S.; KOBAYASHI, K.; TACHIBANA, H.; MATSUMOTO, K. Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall. **J Endod**, v. 21, n. 11, p. 543-545, Nov. 1995.

125. WRIGHT, K. J.; BARBOSA, S. V.; ARAKI, K.; SPÅNGBERG, L. S. W.
In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of kri 1 paste and zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. **J Am Acad Pediatr Dent**, v. 16, n. 2, p. 102-106, Mar./Apr. 1994.
126. YARED, G. M.; DAGHER, F. E. B. Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. **J Endod**, v. 20, n. 11, p. 535-537, Nov. 1994.
127. ZMENER, O.; CABRINI, R. L. Effects of three calcium hydroxide-based materials on human blood monocytes and lymphocytes. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 1, p. 28-32, Feb. 1987.

SUMMARY

COMPARATIVE ANALYSIS OF *IN VITRO* CITOTOXICITY OF IODOFORM AND CALCIUM HYDROXIDE ASSOCIATED WITH TWO DIFFERENTS VEHICLES

The NIH-3T3 Swiss fibroblasts reaction to iodoform and calcium hydroxide associated with two different vehicles was checked by means of viability assays. In order to compare, immediate celular reaction in contact with those substances, in the first part of the study fibroblasts were cultivated in a density of 2×10^4 cells per 60mm Petri dish. After three days, confluent cultures received round glass coverslips containing the substances to be tested. As a control, round glass coverslips were used without substances. After 0, 6, 12 and 24 hours from the initial contact with the substance, control and treated cultures were submitted to trypsinization and the cells were counted in a Neubauer chamber. In the second part of the study, to verify the effect of such substances in the cellular growth and proliferation, fibroblasts were seeded in a density of 1×10^4 cells per 60mm Petri dish. After 4 hours, these cultures received round glass coverslips containing the drugs to be tested. As a control, round glass coverslips were used without substances. After 1, 3, 5 and 7 days from the initial contact with the paste, the control and treated cultures were submitted to trypsinization and the cells were counted in a Neubauer chamber, supplying data for the cellular growth and viability curves. The results showed that, in short term

experiments, there were no statistical differences in the survival rate between the control, calcium hydroxide/carbowax and calcium hydroxide/ polyethylene glycol 400 groups showing that the calcium hydroxide, independently of the vehicle used was biocompatible. In turn, the iodoform associated to the same vehicles, carry most cells to die, after 24 hours. In the long term experiments, the cell survival in calcium hydroxide/carbowax and calcium hydroxide/polyethylene glycol 400 was similar to that of control group. Related to cell proliferation, after 7 days, the number of viable stabilized in the calcium hydroxide/polyethylene glycol 400 group, while when the vehicle used was carbowax, the cell proliferation was similar to that of control group. Iodoform/carbowax group showed cellular proliferation until the fifth day, showing a low number of cells and the cell survival dropped to $28,0043 \pm 6,4801\%$ after 7 days. The iodoform/polyethylene glycol 400 showed *cellular proliferation inhibition starting on the third day* and most cells died after five days ($5,5330 \pm 0,6826 \%$). The results showed that, independently of the vehicle used, the calcium hydroxide showed to be no cytotoxic. On the other hand, the iodoform showed different cytotoxicity levels. When associated to carbowax this substance was less aggressive compared with the iodoform associated to the polyethylene glycol 400.

APÊNDICE

TABELA A - Valores originais da porcentagem de viabilidade celular, por placa de Petri, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de curto prazo

Período Grupo	0 hora			6 horas			12 horas			24 horas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GI	88,383	93,138	88,634	87,579	92,809	88,256	88,139	93,929	88,046	88,614	92,553	92,105
GII	83,615	92,446	95,049	91,050	89,330	91,717	90,612	88,097	88,567	73,507	75,511	94,281
GIII	90,989	92,318	87,546	88,858	87,988	89,336	87,547	86,478	87,604	82,775	82,082	93,702
GIV	93,185	91,887	90,624	87,396	88,121	90,253	87,200	88,309	88,970	39,643	36,753	42,402
GV	88,333	87,879	92,846	88,008	88,923	88,689	86,278	81,038	79,998	18,338	19,513	16,261
GVI	84,503	92,700	95,228	83,319	93,778	94,961	93,458	89,439	85,291	84,075	92,425	90,898
GVII	88,127	87,256	90,718	81,310	92,110	84,921	90,025	85,711	87,394	92,358	89,034	91,050

TABELA B - Valores originais do número de células viáveis($\times 10^4$), por placa de Petri, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de longo prazo

Período Grupo	1 dia			3 dias			5 dias			7 dias		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GI	1,243	1,160	0,976	9,300	8,767	8,533	19,300	17,933	19,567	29,933	28,833	29,100
GII	0,815	1,075	0,907	5,783	3,973	4,353	14,300	15,700	14,033	31,120	27,960	26,433
GIII	0,773	0,627	0,497	4,133	3,300	3,400	10,333	8,967	10,733	24,067	24,900	22,900
GIV	0,773	0,870	0,810	4,300	3,800	4,900	16,967	16,733	13,900	31,733	26,867	24,267
GV	1,436	1,000	1,260	1,523	1,753	1,607	2,467	2,060	1,827	0,453	0,563	0,293
GVI	0,930	0,876	0,740	0,687	0,627	0,680	0,033	0,030	0,023	0,000	0,000	0,000
GVII	0,937	0,997	0,987	7,983	7,650	7,567	16,100	16,600	12,033	29,400	18,933	21,900
GVIII	0,643	0,709	0,620	3,097	5,400	4,567	10,500	8,967	11,433	10,400	9,667	10,700

TABELA C - Valores originais da porcentagem de viabilidade celular, por placa de Petri, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de longo prazo

Período Grupo	1 dia			3 dias			5 dias			7 dias		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GI	88,815	94,309	88,556	88,935	96,277	95,154	90,085	93,082	88,818	89,298	92,210	88,895
GII	80,038	85,397	83,518	86,949	89,351	92,088	82,911	84,083	80,805	80,405	82,072	91,518
GIII	85,294	85,762	84,733	86,919	85,115	88,846	79,280	79,890	91,568	90,541	88,167	86,839
GIV	87,034	85,367	81,352	83,554	89,577	92,561	74,585	74,457	89,777	76,358	77,542	87,240
GV	91,774	93,421	92,633	82,236	90,525	87,214	87,754	90,335	87,872	34,516	34,453	15,044
GVI	90,032	91,335	90,068	79,884	83,634	78,878	6,740	5,482	4,377	0,000	0,000	0,000
GVII	86,950	78,735	79,062	85,964	86,495	90,757	84,664	82,683	88,581	85,559	85,373	90,041
GVIII	71,138	73,298	86,647	85,285	91,776	79,147	73,579	82,970	89,494	88,036	90,014	88,645

TABELA D - Valores originais dos dados transformados (logaritmo dos dados + 1) do número de células viáveis ($\times 10^4$), por placa de Petri, distribuídos de acordo com os tempos experimentais, obtidos com o experimento de longo prazo

Período Grupo	1 dia			3 dias			5 dias			7 dias		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GI	0,35083	0,33445	0,29579	1,01284	0,98976	0,97923	1,30750	1,27722	1,31317	1,49042	1,47470	1,47857
GII	0,25888	0,31702	0,28035	0,83142	0,69662	0,72860	1,18469	1,22272	1,17705	1,50678	1,46180	1,43827
GIII	0,24871	0,21139	0,17522	0,71037	0,63347	0,64345	1,05434	0,99856	1,06941	1,39910	1,41330	1,37840
GIV	0,24871	0,27184	0,25768	0,72428	0,68124	0,77085	1,25448	1,24878	1,17319	1,51499	1,44509	1,40255
GV	0,38668	0,30103	0,35411	0,40192	0,43981	0,41614	0,53995	0,48572	0,45133	0,16227	0,19396	0,11160
GVI	0,28556	0,27323	0,24055	0,22712	0,21139	0,22531	0,01410	0,01284	0,00988	0,00000	0,00000	0,00000
GVII	0,28713	0,30038	0,29820	0,95342	0,93702	0,93283	1,23300	1,24551	1,11504	1,48287	1,29957	1,35984
GVIII	0,21564	0,23274	0,20952	0,61247	0,80618	0,74562	1,06070	0,99856	1,09458	1,05690	1,02804	1,06819

Autorizo a reprodução pelos interessados.

Rosângela Lustosa d'Ávila Pinheiro Daniel

São Paulo, maio de 1998.

