

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

GABRIELA BESS FERRAZ BLATTES

MIGRAÇÃO CELULAR, VIABILIDADE E REAÇÃO TECIDUAL DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS À BASE DE HIPOCLORITO DE CÁLCIO: ESTUDO *IN VITRO* E
IN VIVO.

Porto Alegre
2015

GABRIELA BESS FERRAZ BLATTES

MIGRAÇÃO CELULAR, VIABILIDADE E REAÇÃO TECIDUAL DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS À BASE DE HIPOCLORITO DE CÁLCIO: ESTUDO *IN VITRO* E
IN VIVO.

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – subárea Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Soares Grecca

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Blattes, Gabriela Bess Ferraz
Migração Celular, Viabilidade e Reação Tecidual de
Soluções Irrigadoras à base de Hipoclorito de Cálcio:
Estudo in vitro e in vivo / Gabriela Bess Ferraz
Blattes. -- 2015.
41 f.

Orientador: Fabiana Soares Grecca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hipoclorito de Cálcio. 2. Hipoclorito de Sódio.
3. Biocompatibilidade. 4. Citotoxicidade. 5.
Endodontia. I. Grecca, Fabiana Soares, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que pela Sua misericórdia me guiou e sustentou até aqui. Toda glória a Ele.

A meu esposo, Juliano, meu melhor amigo e amor, pela parceria e paciência durante esses dois anos. Obrigada por ter abraçado esse projeto comigo!

À minha família: meu pai, Cicero, minha mãe, Lana, meus irmãos, Eduardo e Gustavo, meus cunhados, Letícia e Adriano, meu sobrinho Leonardo e meus sogros, João e Lenita. Muito obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, apoiando e incentivando essa caminhada.

À minha orientadora, Fabiana, por tantos aprendizados, pela confiança e carinho comigo. Sou imensamente grata a você!

À Letícia Mestieri, colega de pós graduação e também minha “professora” na cultura de células. Muito obrigada pelos ensinamentos e por tua dedicação nesse trabalho, que não seria possível sem você.

À Daiana Böttcher, que muito me auxiliou na pesquisa *in vivo*. Dai, obrigada pela tua ajuda e amizade!

Aos meus colegas de mestrado: Angela Longo, Flávia Baldasso, Karen Barea, Israel Carlotto e Natália Leonardo. Agradeço a Deus pela vida de vocês, por ter tido a oportunidade de conhecê-los e por terem tornado esse mestrado muito melhor! Desejo tudo de bom para vocês!

Aos demais colegas da pós graduação, em especial à Ivana Zaccara, Ludmila Moraes, Pauline Lang. Muito obrigada pela amizade e carinho de vocês.

Aos professores da Endodontia, com quem pude aprender muito: Francisco Montagner, João Ferlini, Régis Burmeister, Simone Luisi, Marcus Só, Renata Grazziotin e Patrícia Móra.

À Andrea Dill, secretaria e “braço-direito” de todos da Endodontia. Muito obrigada por facilitar nosso trabalho com tua organização, presteza e cuidado.

A todo pessoal do Laboratório de Patologia, pela ajuda constante e por dividirem o espaço e conhecimento de vocês comigo! Um agradecimento especial

a Prof^a. Dr^a. Anna Fossati, que foi fundamental e incansável nas análises do experimento *in vivo*.

Ao pessoal do Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (ICBS), pela contribuição e cuidado com nossos animais do teste *in vivo*.

À UFRGS e ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, pela oportunidade de aprender e desenvolver este trabalho.

Por último, porém não menos importante, gostaria de agradecer aos meus amigos além UFRGS, que há mais de dois anos vem me acompanhando nessa caminhada da vida, tornando-a mais leve.

Enfim, agradeço a todos os meus amigos, colegas e outros profissionais que contribuíram para a construção deste trabalho e que, eventualmente, eu não tenha lembrado de citar. Muito obrigada!

“Eu, porém, confio em teu amor; o meu coração exulta em tua salvação. Quero cantar ao Senhor pelo bem que me tem feito.”

Salmo 13:5-6

RESUMO

BLATTES, Gabriela Bess Ferraz. **Migração Celular, Viabilidade e Reação Tecidual de Soluções Irrigadoras à base de Hipoclorito de Cálcio: Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2015. 41 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Introdução: O objetivo do presente estudo foi analisar a citotoxicidade e biocompatibilidade de soluções de hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) comparadas a soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) *in vitro* em cultura de fibroblastos 3T3 e *in vivo* em ratos. **Metodologia:** Culturas de fibroblastos 3T3 foram expostas a diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio e sódio e foi realizado um ensaio de “scratch”. Além disso, a taxa de viabilidade foi analisada utilizando o teste Azul de Trypan. As soluções a 1 e 2,5% foram, também, injetadas no tecido conjuntivo de 18 ratos Wistar de 18 semanas de idade. A reação inflamatória tecidual foi avaliada em 2h, 24h e 14 dias após as injeções e as amostras foram qualitativamente analisadas em microscópio óptico. Análise estatística foi realizada utilizando teste ANOVA e post hoc de Tukey para testes *in vitro* e Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn para o teste *in vivo* ($\alpha=0.05$). **Resultados:** No ensaio de “scratch”, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ não apresentou diferença estatística em relação ao controle no período de 24h ($p < 0.05$). NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0.0075% e 0.005% apresentaram resultados de viabilidade similar ao grupo controle positivo ($p > 0.05$) no ensaio Azul de Trypan. No teste *in vivo*, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1% mostrou uma diminuição significativa de neutrófilos entre 2h e 24h ($p=0.041$) e entre 2h e 14d ($p=0.017$). Não houve diferença estatística entre os grupos para linfócitos/plasmócitos e macrófagos. **Conclusão:** $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ mostrou resultados favoráveis de viabilidade e induziu um baixo nível de resposta inflamatória tecidual, apresentando, assim, citotoxicidade e biocompatibilidade aceitáveis para uma solução irrigadora.

Palavras-chave: Hipoclorito de cálcio, Hipoclorito de Sódio, Biocompatibilidade, Citotoxicidade, Endodontia.

ABSTRACT

BLATTES, Gabriela Bess Ferraz. **Cell Migration, Viability and Tissue Reaction of Calcium Hypochlorite Based-Solutions Irrigants: An *in vitro* and *in vivo* Study**. 2015. 41 f. Dissertation (Master Degree in Dentistry) – School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Introduction: The aim of the present study was to analyze cytotoxicity *in vitro* on cultured 3T3 fibroblasts and inflammatory tissue reaction *in vivo* on rats to calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) solutions compared with sodium hypochlorite (NaOCl) solutions. **Methods:** Cultured 3T3 fibroblasts were exposed to different concentrations of calcium and sodium hypochlorite and a scratch assay was performed. The viability rate was analyzed with Trypan Blue assay. A. The 1 and 2.5% solutions were still injected into the subcutaneous tissues of eighteen male Wistar rats aged 18 weeks. Inflammatory tissue reaction was evaluated at 2h, 24h and 14 days after the injections and the samples were qualitatively analyzed through a light microscope. Statistical analysis was assessed by ANOVA and Tukey post hoc test for *in vitro* assays and by Kruskal-Wallis and Dunn post hoc test for *in vivo* assay ($\alpha=0.05$). **Results:** In scratch assay, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ showed no statistically significant difference to control group at 24h ($p < 0.05$). 0.0075% and 0.005% NaOCl and $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ presented results similar to positive control group ($p > 0.05$) on Trypan Blue assay. In *in vivo* assay, 1% calcium hypochlorite group showed a significant decrease of neutrophils at 2h and 24h ($p=0.041$) and 2h and 14d ($p=0.017$). There was no statistically significant difference for lymphocytes/plasmocytes and macrophages among groups. **Conclusions:** $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ showed favorable results of viability and induced a low level of inflammatory response, thus presenting an acceptable cytotoxicity and biocompatibility for an irrigant solution.

Keywords: Calcium hypochlorite, sodium hypochlorite, biocompatibility, cytotoxicity, Endodontics.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	8
1.1 HIPOCLORITO DE SÓDIO	8
1.2 HIPOCLORITO DE CÁLCIO.....	13
1.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E BIOCAMPATIBILIDADE	14
2 OBJETIVOS	16
3 ARTIGO	17
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	40

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O preparo químico mecânico é considerado pela maioria dos autores como uma das fases mais importantes do tratamento endodôntico, sendo um dos princípios básicos do tratamento dos canais radiculares (AUERBACH, 1953; STEWART et al., 1961; SCHILDER, 1974; LEONARDO & LEONARDO, 2012). Essa fase do tratamento tem por objetivo promover a limpeza e a modelagem do canal radicular, por meio do emprego de instrumentos endodônticos, de substâncias ou soluções químicas auxiliares e da irrigação - aspiração (PAIVA & ANTONIAZZI, 1991; SCHILDER, 1974).

Em função da complexidade da anatomia do sistema de canais radiculares, sabe-se que apenas a ação mecânica dos instrumentos endodônticos não é suficiente e, por isso, o papel das soluções irrigadoras durante o tratamento endodôntico é fundamental (VILLAS BÔAS et al., 2011).

Segundo alguns autores (GOMES-FILHO et al., 2008; ÖNÇAG et al., 2003; PISKIN & TÜRKÜN, 1995; YESILSOY et al., 1995), uma solução irrigadora ideal deveria apresentar características favoráveis que incluem máxima capacidade de dissolução tecidual e ampla atividade antimicrobiana além de induzir leve ou nenhuma resposta inflamatória aos tecidos periapicais. Dentro deste contexto, muitos agentes químicos já foram propostos para uso na terapia endodôntica, entre eles, o mais utilizado atualmente, hipoclorito de sódio (STOIJICIC et al., 2010; SCHILDER, 1974; ÖNÇAG et al., 2003; GUNESER et al., 2015; MOHAMMADI, 2008; GOMES-FILHO et al., 2008; GERNHARDT et al., 2004).

1.1 HIPOCLORITO DE SÓDIO

As soluções de hipoclorito começaram a ser amplamente utilizadas durante a Primeira Guerra Mundial para limpeza e desinfecção de feridas dos soldados (DAKIN & DUNHAM, 1917). Na Endodontia, seu uso foi inicialmente recomendado por Blass e difundido por Walker, em meados de 1940 (LEONARDO & LEONARDO, 2012).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um composto halogenado, de cor clara, odor característico e apresenta baixo custo. Encontra-se disponível em diferentes

concentrações, entre elas, as mais conhecidas e utilizadas são: o líquido de Dakin (0,5% de cloro ativo), solução de Milton (1% de cloro ativo), licor de Labarraque (2,5% de cloro ativo) e Soda Clorada (concentração variável entre 4 e 6%) (ESTRELA, 2004; LEONARDO & LEONARDO, 2012).

Esta solução apresenta importantes propriedades, entre as quais destaca-se a sua capacidade de baixar a tensão superficial, capacidade de neutralizar parcialmente os produtos tóxicos, diminuindo a possibilidade de disseminação de bactérias na região apical; poder bactericida, através da liberação de oxigênio e cloro; pH alcalino (em torno de 11 a 12), neutralizando a acidez e tornando o meio impróprio para o desenvolvimento bacteriano; ação solvente do tecido pulpar; capacidade de desidratar e solubilizar substâncias proteicas, transformando-as em matérias facilmente elimináveis do sistema de canais radiculares, e ação detergente, agindo sobre os ácidos graxos, saponificando-os. (LEONARDO & LEONARDO, 2012)

A capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio é um dos principais motivos pelos quais ele continua sendo a solução irrigadora mais utilizada. Diferentemente da maioria das demais soluções utilizadas no tratamento endodôntico, o hipoclorito de sódio em contato com o material orgânico produz uma reação de saponificação, isto é, ele dissolve ácidos graxos, transformando-os em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), reduzindo, assim, a tensão superficial da solução remanescente e, conseqüentemente, favorecendo a penetração da solução no sistema de canais radiculares bem como facilitando a ação dos instrumentos (MOHAMMADI, 2008).

O seu alto pH também é um fator em vantagem sobre os demais irrigantes, pois ele está diretamente relacionado a sua ação antimicrobiana. Em solução aquosa, o NaOCl sofre ionização liberando ácido hipocloroso (HOCl) e íons hidroxila, que interferem na membrana citoplasmática, inibem de forma irreversível importantes enzimas bacterianas, gerando alterações biossintéticas no metabolismo celular e destruição fosfolipídica (ZEHNDER, 2006; ESTRELA, 2004; MOHAMMADI, 2008).

Estudos já mostraram o poder do NaOCl sobre vírus (MATSUHIRA et al., 2012), fungos (*Candida albicans*) e bactérias como *Enterococcus faecalis*,

Fusobacterium nucleatum, *Peptostreptococcus anaerobius* (MISURIYA et al., 2014).

No entanto, o hipoclorito de sódio apresenta considerável instabilidade química. A literatura nos mostra que a concentração de íons cloro disponível na solução é influenciada por agentes externos tais como temperatura, presença de luminosidade e condições de armazenamento. Esses fatores afetam a manutenção e preservação das propriedades das soluções cloradas e, conseqüentemente, afetam o resultado do tratamento endodôntico (NICOLETTI & MAGALHÃES, 1996; FRAIS et al., 2001; TÜRKÜN, 1998; MOHAMMADI, 2008; ZEHNDER, 2006).

Frais et al. (2001) verificaram que o período de armazenamento, assim como as condições de diluição e aquecimento, podem influenciar a concentração de hipoclorito de sódio empregada, sugerindo ainda um controle criterioso no armazenamento (em temperaturas frias, num lugar escuro ou em um recipiente opaco e com tampa hermética) e diluição das soluções, para que concentrações corretas sejam atingidas.

Piskin & Türkün (1995) também avaliaram os efeitos da temperatura de armazenamento, concentração e tempo na estabilidade das soluções de hipoclorito de sódio, constatando haver degradação destas com o tempo. As soluções armazenadas em temperaturas maiores (24°C) apresentaram degradação mais rápida em relação as armazenadas a 4°C, independente da concentração testada. O autor ainda afirma que, se armazenadas nas condições corretas, as soluções podem se manter estáveis por até 200 dias.

Outra limitação do uso do NaOCl, seria a diminuição da resistência à flexão e do módulo de elasticidade da dentina (DIMITRIU et al., 2015; SIM et al., 2001; GRIGORATOS et al., 2001; MARENDING et al., 2007). O módulo de elasticidade descreve a relativa rigidez ou dureza da dentina e resistência à flexão é a resistência máxima que a dentina apresenta antes que ocorra a fratura (SIM et al., 2001). A dentina é composta por aproximadamente 22% de matéria orgânica, sendo a maior parte constituída por colágeno do tipo I, que contribui consideravelmente para as propriedades mecânicas da dentina (MARENDING et al., 2007).

Pensando que o hipoclorito tem a capacidade de dissolver substâncias proteicas, é plausível supor que ele também possa dissolver o material orgânico da dentina radicular, afetando, dessa forma, suas propriedades. Dimitriu et al. (2015) estudaram a influência da temperatura e concentração do hipoclorito de sódio na dissolução do colágeno e verificaram que o aumento tanto da temperatura quanto da concentração provocam um aumento na taxa de dissolução de colágeno. No entanto, um estudo recente testando diferentes concentrações de NaOCl, verificou que, embora houvesse uma tendência para a diminuição da resistência a flexão com o aumento da concentração da solução, não houve diferença estatística para nenhum dos grupos testados, tanto para resistência a flexão quanto para módulo de elasticidade da dentina (CULLEN et al., 2015), contrariando outras pesquisas com metodologia semelhante (SIM et al., 2001; GRIGORATOS et al., 2001; MARENDING et al., 2007).

Há ainda estudos que apontam a baixa habilidade do NaOCl para inativação de endotoxina (BUCK et al., 2001) e ineficácia na remoção e/ou prevenção da formação de *smear layer* (UROZ-TORRES et al., 2010).

Durante o tratamento endodôntico, a solução irrigadora pode entrar em contato e/ou ser extravasada para a região periapical. Canais em bacamarte, perfurações, reabsorções radiculares e dentes com rizogênese incompleta podem propiciar esse contato com os tecidos periodontais. Em função disso, a citotoxicidade e biocompatibilidade de um irrigante é um importante fator a ser considerado (BARNHART et al., 2005).

O NaOCl tem sido relatado com alta toxicidade tecidual, podendo causar acidentes sérios quando extravasado para a região periapical ou através do dique de borracha (ÖNÇAG et al., 2003; YESILSOY et al., 1995; GOMES-FILHO et al., 2008; GERNHARDT et al., 2004, ZEHNDER, 2006; MARINS et al., 2012). Entretanto, não foi identificada genotoxicidade do NaOCl a 2,5% (AUBUT et al., 2010).

Aubut et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade do NaOCl e verificaram que o NaOCl 2,5% foi mais tóxico que o NaOCl 0,5%, mostrando haver uma relação concentração-dependente da citotoxicidade do NaOCl, ou seja, aumentando a concentração da solução, aumenta-se também seu efeito sobre as células, fato também reportado por outros autores (ZHANG et al., 2003; ESCOBAR-NAVARRO

et al., 2010; SIMBULA et al., 2010). No entanto, em diluições muito baixas (1/1000), os autores não encontraram diferença estatística em relação ao controle negativo.

Além da relação concentração-dependente, Alkahtani e colaboradores (2014), reportaram uma relação tempo-dependente para a citotoxicidade do NaOCl. Os autores avaliaram o reação desse irrigante em células tronco mesenquimais da medula óssea humana e observaram que a viabilidade celular diminuiu com o tempo. Avaliações foram feitas em 2, 4 e 24 horas de exposição ao agente químico.

Outro estudo, utilizando ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade do NaOCl 2,5% comparada ao ácido cítrico 15% e ácido fosfórico 5%, mostrou uma aceitável viabilidade celular (63,39%) para o grupo do NaOCl, sem diferença estatística para o grupo do ácido cítrico (NAVARRO-ESCOBAR et al., 2010).

Alguns estudos *in vivo* também foram realizados (ÖNÇAG et al., 2003; YESILSOY et al., 1995; GOMES-FILHO et al., 2008). Em todos eles, o NaOCl a 5,25% gerou uma alta e significativa reação inflamatória, sendo considerado tóxico em tecidos vivos. Yesilsoy afirma que o uso do hipoclorito de sódio como irrigante deve ser cuidadoso, pois a ação dissolvente desta solução não é seletiva para tecidos vivos ou necróticos, podendo ter uma ação mais deletéria do que benéfica, conforme o uso. Além do significativo número de células inflamatórias encontrado nos tecidos expostos ao hipoclorito de sódio, verificou-se também um reparo tardio em relação às outras soluções testadas. Gomes-Filho confirmou este achado, mostrando que o hipoclorito de sódio a 5,25% gerou formação de granuloma no final de 14 dias.

Está bem estabelecido que a maioria das propriedades do NaOCl é diretamente proporcional à sua concentração, ou seja, quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio, maior será sua atividade antimicrobiana e a dissolução tecidual, por exemplo. No entanto, maior será também seu potencial de toxicidade sobre os tecidos vivos. (STEWART et al., 1961; GROSSMAN, 1936; GROSSMAN & MEIMAN, 1941; ABOU-RASS & OGLESBY, 1981; HOFFMAN et al., 1991; CHU et al., 2004; JOHNSON et al., 2004).

Conhecendo as limitações do NaOCl e buscando uma solução que cumpra o máximo de requisitos de um irrigante ideal, surge, nesse contexto, o hipoclorito de cálcio.

1.2 HIPOCLORITO DE CÁLCIO

O hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) é um composto halogenado comercializado na forma de um pó. Inicialmente seu uso foi proposto por Whitakker e Mohler, em 1911, para esterilização de garrafas de leite, mas atualmente é bastante empregado no tratamento de águas em piscinas (de ALMEIDA et al., 2014; WHITAKKER & MOHLER, 1911).

Demonstra ser um composto relativamente estável, com um percentual de íons cloro disponível superior ao do NaOCl (cerca de 65%) (DUTTA et al., 2012; WHITAKKER & MOHLER, 1911).

Em solução aquosa, ocorre a seguinte reação: $\text{Ca}(\text{OCl})_2 + 2 \text{H}_2\text{O} = 2 \text{HOCl} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ (DUTTA et al., 2012; WHITAKKER & MOHLER, 1911). Em função disso, tem sido sugerido que o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ poderia apresentar melhores propriedades antimicrobianas do que o NaOCl por haver liberação tanto de ácido hipocloroso quanto de hidróxido de cálcio, que tem ação antibacteriana bem conhecida, agindo inclusive na inativação de endotoxina (DUTTA et al., 2012; BUCK et al., 2001; LEONARDO & LEONARDO, 2012).

Poucas pesquisas foram realizadas com o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ como solução irrigadora na Endodontia, alguns estudos já foram realizados no intuito de avaliar a ação antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 2,5% e foi verificado que não houve diferença estatística na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Enterococcus faecalis* entre amostras irrigadas com $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e amostras irrigadas com NaOCl (de ALMEIDA et al., 2014).

Twomey et al. (2003) também testaram o hipoclorito de cálcio como desinfetante de moldeiras e encontraram resultados bem satisfatórios na inativação do bacilo *phi29*.

Dutta et al. (2012) compararam o potencial de dissolução tecidual de soluções de hipoclorito de sódio e de hipoclorito de cálcio na concentração de 5% e 10% e observaram uma dissolução mais acentuada de tecido muscular

bovino para as soluções de hipoclorito de sódio do que para as soluções de hipoclorito de cálcio, no período de 35 minutos. Entretanto após 60 minutos de imersão, o padrão de dissolução tecidual foi similar. Os autores sugerem que as soluções de hipoclorito de cálcio, por apresentarem velocidade de dissolução inferior, possam ser menos agressivas aos tecidos apicais do que as soluções de hipoclorito de sódio.

Em relação aos efeitos do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ sobre a dentina, Ferreira et al. (2015), utilizando dentes humanos extraídos, analisaram a influência da remoção de colágeno da dentina com NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ na microinfiltração de restaurações em resina composta. Não foi encontrado diferença na microinfiltração quando se utilizou o hipoclorito de cálcio ou sódio na desproteinização da dentina antes da inserção do material restaurador.

Mais estudos precisam ser realizados para indicar o uso do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em Endodontia, já que este apresenta maior estabilidade e maior disponibilidade de íons cloro em relação ao NaOCl .

1.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE

A aceitação do uso de um determinado produto deve ser baseada em trabalhos experimentais e laboratoriais que comprovem, entre outras propriedades, a sua biocompatibilidade. Biocompatibilidade é a capacidade de um material de executar o objetivo para o qual foi aplicado, gerando uma adequada resposta do hospedeiro (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas de modo a elucidar com maior clareza o potencial irritante dos materiais. Os testes iniciais recomendados são aqueles que envolvem cultura de células, que podem incluir ensaios de citotoxicidade e/ou genotoxicidade. Em seguida, os testes em animais são recomendados, ampliando, dessa forma, o conhecimento do comportamento da substância testada em relação aos tecidos investigados, no caso da Endodontia, sobre os tecidos apicais e periapicais, possibilitando, limitadamente, prever seus efeitos sobre eles. (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009; SCARPARO et al., 2010).

Entre os ensaios de citotoxicidade, um dos mais utilizados atualmente na avaliação de materiais odontológicos é o teste Azul de Trypan, que determina o número de células viáveis em uma suspensão de células. Baseia-se no princípio de que células vivas apresentam membrana intacta e não são coradas por esse produto, portanto ele colore apenas as células mortas. Para isso há a necessidade de que o pesquisador conte manualmente as células através do uso de um hemocitômetro (MARINS et al., 2012).

Em 2007, Liang et al. com o objetivo de verificar e medir a migração celular *in vitro*, descreveram um método chamado ensaio de “*scratch*”, que do inglês significa “arranhão” ou “risco”. É um ensaio relativamente simples, conveniente e de baixo custo. Consiste em criar um risco em uma monocamada de células confluentes em placa de cultura, com o uso de uma ponteira de uma micropipeta e capturar imagens em intervalos regulares durante a migração celular até o completo fechamento desse risco. As imagens são então comparadas afim de mensurar a taxa de migração das células com o tempo. Este ensaio, segundo os autores que o descreveram, consegue mimetizar o processo de reparo *in vivo*.

Em relação aos estudos em animais, a implantação/injeção de amostras dos materiais no tecido conjuntivo é considerado um teste adequado para avaliação da biocompatibilidade de materiais endodônticos (OLSSON et al., 1981). As normas divulgadas pela *American Dental Association* e *Fédération Dentaire Internationale* consideram os métodos de implante/injeção como testes válidos nas etapas preliminares de pesquisa da histocompatibilidade de diversos materiais odontológicos.

Segundo Mittal et al. (1995), o teste em ratos é uma forma econômica de se testar os efeitos biológicos dos materiais endodônticos. As semelhanças entre ratos e humanos apareceram de forma mais específica depois da melhor concepção da biologia dos ratos obtida pelo mapeamento da maior parte de seu genoma, em 2004, o que é muito útil para estudos fisiológicos e farmacológicos.

No que diz respeito a biocompatibilidade e citotoxicidade do hipoclorito de cálcio, não existem estudos na literatura que avaliem essas propriedades. Torna-se relevante sua análise e uma maior investigação das demais propriedades para que este composto possa vir a ser empregado como substância química auxiliar no preparo do sistema de canais radiculares.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a citotoxicidade e biocompatibilidade de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio e compará-las com o hipoclorito de sódio *in vitro* e *in vivo*.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- a) Avaliar e comparar o tempo necessário para reparo e a taxa de migração celular de fibroblastos de ratos 3T3 expostos a soluções de hipoclorito de cálcio e sódio, através do ensaio de “*scratch*”;
- b) Avaliar e comparar a viabilidade celular de fibroblastos de ratos 3T3 expostas a diferentes concentrações de soluções de hipoclorito de cálcio e sódio, através do teste Azul de Trypan;
- c) Comparar a presença de células inflamatórias apresentadas no tecido conjuntivo de ratos expostos a diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio e sódio, nos diferentes períodos experimentais.

3 ARTIGO

O artigo apresentado nesta dissertação segue as normas exigidas pelo periódico *Journal of Endodontics*, para o qual será submetido à publicação. As figuras serão excepcionalmente aqui mostradas junto ao manuscrito, para melhor entendimento do leitor.

CELL MIGRATION, VIABILITY AND TISSUE REACTION OF CALCIUM HYPOCHLORITE BASED-SOLUTIONS IRRIGANTS: AN *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY.

Gabriela Bess Ferraz Blattes, DDS^a, Leticia Boldrin Mestieri, DDS, MSc^a, Daiana Elisabeth Böttcher, DDS, MSc, PhD^b, Anna Cristina Medeiros Fossati, DDS, MSc, PhD^c, Francisco Montagner, DDS, MSc, PhD^d, Fabiana Soares Grecca, DDS, MSc, PhD^d.

^aPost-Graduation Student, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre;

^bPost-Doctoral Research Fellow, Department of Endodontics, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul;

^cDepartment of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul;

^dDepartment of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul;

ABSTRACT

Introduction: The aim of the present study was to analyze cytotoxicity *in vitro* on cultured 3T3 fibroblasts and inflammatory tissue reaction *in vivo* on rats to calcium hypochlorite (Ca(OCl)₂) solutions compared with sodium hypochlorite (NaOCl) solutions. **Methods:** Cultured 3T3 fibroblasts were exposed to different concentrations of calcium and sodium hypochlorite and a scratch assay was performed. The viability rate was analyzed with Trypan Blue assay. A. The 1 and 2.5% solutions were still injected into the subcutaneous tissues of eighteen male

Wistar rats aged 18 weeks. Inflammatory tissue reaction was evaluated at 2h, 24h and 14 days after the injections and the samples were qualitatively analyzed through a light microscope. Statistical analysis was assessed by ANOVA and Tukey post hoc test for *in vitro* assays and by Kruskal-Wallis and Dunn post hoc test for *in vivo* assay ($\alpha=.05$). **Results:** In scratch assay, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ showed no statistically significant difference to control group at 24h ($p<0.05$). 0.0075% and 0.005% NaOCl and $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ presented results similar to positive control group ($p > 0.05$) on Trypan Blue assay. In *in vivo* assay, 1% calcium hypochlorite group showed a significant decrease of neutrophils at 2h and 24h ($p=0.041$) and 2h and 14d ($p=0.017$). There was no statistically significant difference for lymphocytes/plasmocytes and macrophages among groups. **Conclusions:** $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ showed favorable results of viability and induced an low level of inflammatory response, thus presenting an acceptable cytotoxicity and biocompatibility for an irrigant solution.

Keywords: Calcium hypochlorite, biocompatibility, cytotoxicity, scratch assay, Endodontics.

INTRODUCTION

Chemomechanical preparation aims to promote the root canal cleaning and shaping by using endodontic instruments and auxiliary chemical solutions (1-3). Due to the anatomical complexity of root canal system, irrigating solutions are fundamental to promote an effective cleaning during treatment (1-8). The most frequently employed substance is sodium hypochlorite (NaOCl) (1-7).

NaOCl is bactericidal due to its high pH, it presents low surface tension, detergent action and tissue dissolution capacity (1-7,9). Despite higher concentrations significantly improve the antimicrobial and tissue-dissolving effects of sodium hypochlorite, they become more cytotoxic and induce inflammatory response when in contact with periapical tissues (1,3,5-7,9-10).

Another important limitation on use of NaOCl is its chemical instability. External agents such as temperature, presence of light and storage conditions

influence the availability of ions chlorine, affecting the maintenance and preservation of its properties, influencing the outcome of endodontic treatment (11). Therefore, other strategies might be considered to be used.

In this context, calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) is a halogenated compound, used for industry sterilization, bleaching and purifying water (12,13). Differently from NaOCl, it is relatively stable with an available chlorine ions percentage higher than NaOCl (12,13). According to previous studies, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ has the ability to promote soft-tissue dissolution (12) and presents similar antibacterial properties when compared with NaOCl on *Enterococcus faecalis* colony-forming unit counting in infected bovine teeth (14). Nonetheless, there is no available data in the literature concerning cytotoxicity and tissue reaction of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$.

The aim of the present study was to compare cytotoxicity and biocompatibility of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ and NaOCl *in vitro*, using Scratch and Trypan blue assays on cultured 3T3 fibroblasts and, *in vivo*, by the reaction of rat connective tissue. So that, along with other studies, it will be possible to verify if calcium hypochlorite can be employed as auxiliary chemical substance in root canal system preparation.

MATERIAL AND METHODS

Cytotoxicity assays

The present study was approved by the Research Committee of the School of Dentistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (nº. 26578).

Cell Culture

3T3-L1 fibroblasts (ATCC CRL-1658) were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 condition. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich) and 1% penicillin and

streptomycin (PenStrep, Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Canyon City, Oregon, USA). At 80% confluence, cells were treated with 0.25% Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) to plate.

Scratch assay

This test was performed in a modified method proposed by Liang et al. (2007) (15). 3T3 fibroblasts were seeded in a 35 mm Petri dish at 2×10^6 concentration. After 24h incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity, a scratch was create in the cell monolayer with a P200 pipete tip (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Culture medium was replaced according to the groups: control group (DMEM), 0.00075% Ca(OCl)₂ and 0.00075% NaOCl. After this, the plate was placed into an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) with a charge coupled device camera (AxioCam mri, Zeiss, Göttingen, Germany) using a 10x objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss, Göttingen, Germany) and AxioVision Software (Zeiss, Göttingen, Germany). Images were taken every 10 minutes until the scratch was closed and were analyzed using ImageJ Software.

Trypan Blue assay

Cells were plated in 96-well plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brazil) at a concentration of 1×10^5 cells/mL. After 24 hours, the medium was removed and replaced by 100 µL of the tested solutions diluted with DMEM supplemented with 1% PenStrep. The following Ca(OCl)₂ and NaOCl concentrations were used: 0.0075%, 0.005%, 0.00075% and 0.0005%. The number of plated cells and the determination of the concentrations used were previously determined by cell growth curve and IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) determination. Culture medium was used as negative control (CT-); hydrogen peroxide 10mM was used as positive control (CT+). Viability was measured.

After 24h, culture medium of plates was removed and 100 µL of 0.25% Trypsin-EDTA was added to each well for 3 minutes to detach the cells. The cell suspension in the well was mixed with 100 µL of 0.4% Trypan Blue (Sigma-Aldrich). After that, 10 µL of this suspension was counted using a dropped into a

hemocytometer chamber under a inverted light microscope. Cell viability rate was calculated by the formula: % viable cells = (n° live cells / total number of cells) x 100.

The assay was performed in duplicate (n=10/group).

Biocompatibility assay

The biocompatibility study was approved by the Research Board and by the Ethics Committee for Animal Use in Research (protocol number 26102), following the National guidelines from the National Council for Ethics in Animal Experiments (CONCEA).

The following irrigating solutions were tested: 1% calcium hypochlorite (1% Ca(OCl)₂), 2.5% calcium hypochlorite (2.5% Ca(OCl)₂), 1% sodium hypochlorite (1% NaOCl), 2.5% sodium hypochlorite (2.5% NaOCl) and 0.9% sterile saline (0.9% NaCl). Except for sterile saline, all solutions were prepared one day before the experiment.

Eighteen male *Wistar* rats aged 18 weeks were used for experiments. The animals were divided into 3 groups of 6 rats each, according to experimental periods (2 hours, 24 hours and 14 days).

Under anesthesia with 0.008 mL/100 g ketamine (Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários S.A., Louveira, Brazil) and 0.004 mL/ 100 g 2% xylazine hydrochloride (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, Brazil), the dorsal skin of the animals were shaved and cleaned with 10% iodine solution. Using a paper template and indelible pen (A. W. Faber-Castell S.A., São Carlos, Brazil), six circles were demarcated on the dermis of each rat leaving at least 2 cm between each circle. With disposable insulin syringes (Injex Indústria Cirúrgica Ltda, Ourinhos, Brazil) and standard depth needle, 0.1 mL of each solution was injected subcutaneously into one of the 5 circles. In the 6th circle the needle of an empty syringe was introduced (no irrigant - negative control group). Solutions location was randomized in each animal.

By the end of each experimental period (2h, 24h, 14d), all animals of each group were euthanized by anesthetic overdose with 120 mL/kg pentobarbital (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, Brazil). Immediately, tissue specimens were removed and fixed in 10% formalin solution (LabSynth Produtos para Laboratório LTDA, São Paulo, Brazil) for 48 h. After fixation, specimens were embedded in paraffin and sections with 3 μ m thickness were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

Three blinded and calibrated examiners ($k= 0.79$, $P< 0.01$) analyzed the slices under a light microscope (Olympus BX41 – Olympus America Inc., Melville, NY, EUA), using 40, 100, 400, and 1000x magnification. Cellular events were analyzed according to the description of the following inflammatory cells: neutrophils, eosinophils, lymphocytes/plasmocytes, macrophages and giant cells. Each one of these elements was classified as follows: (0) absent, (1) mild, (2) moderate and (3) intense.

Statistical Analysis

In vitro assays were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc tests, considering a level of significance of 5%. *In vivo* assay was statistically evaluated by using Kruskal-Wallis followed by Dunn post hoc test at a 5% significance level. All data were evaluated using the software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Scratch assay

Control group was the first that covered 100% scratch area, at 24h. At this time, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ group was 84,32% and NaOCl group was 43,78% cell covered area. Statistical analysis was done until 24h and a difference was found at this time, where $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ was similar to CT+ and different to NaOCl ($p<0.05$).

$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ took 28,5h to close the scratch and NaOCl took 41,7 hours (Figure 1 and 2).

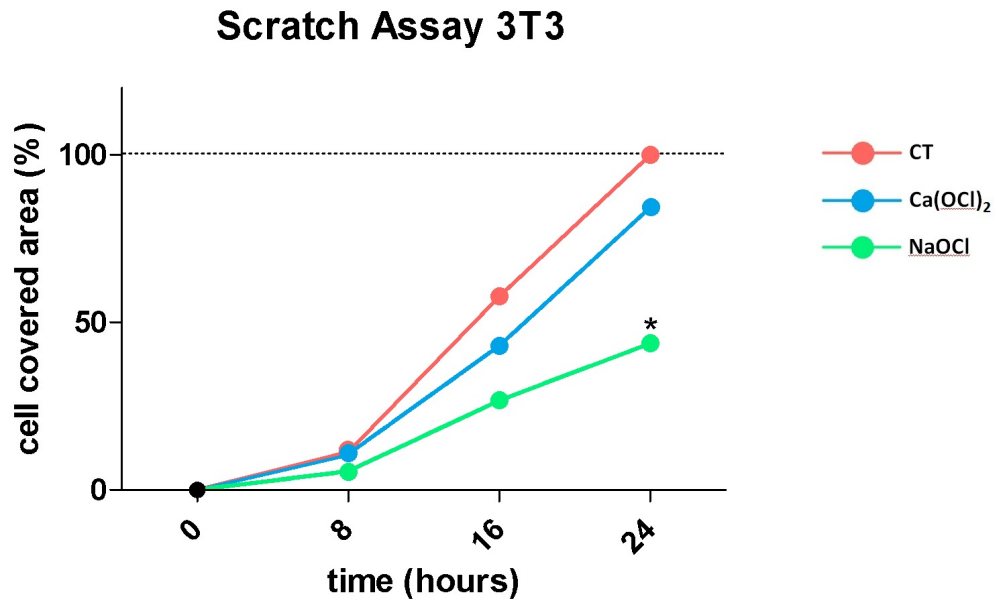


Figure 1: Differences on groups by cell covered area (%) over time. * $P < 0.05$

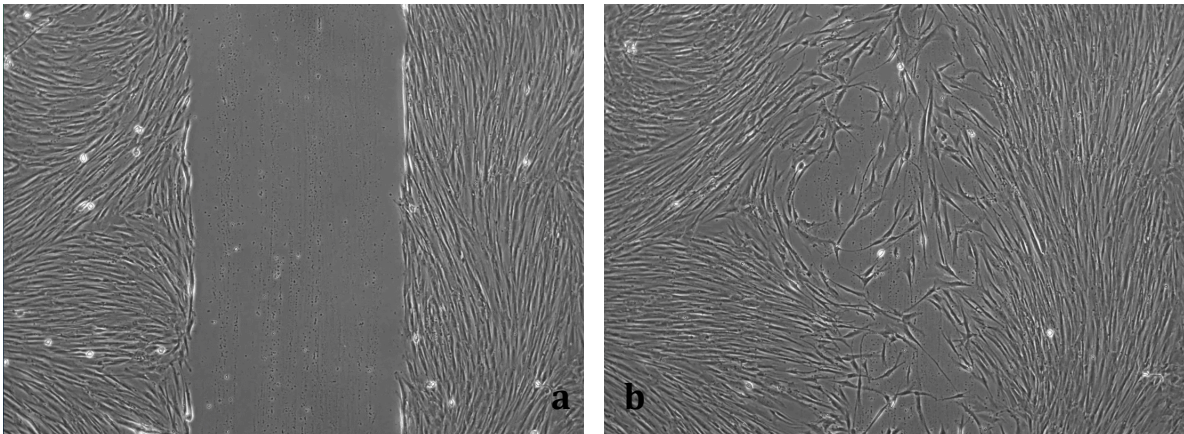


Figure 2: Images of scratch assay. (a) at the initial time; (b) at the end time, with cells covering the scratch area.

Cytotoxicity assay

Trypan Blue demonstrated increase in viability rate proportionally to the dilutions of the irrigant solutions. The 0.0075% and 0.005% dilutions of both irrigants showed the lowest viability when compared with 0.0005% ($p < 0.05$).

All dilutions presented viability rate lower than CT- ($p < 0.05$). The 0.0075% and 0.005% concentrations presented results similar to CT+ ($p > 0.05$) (Figure 3).

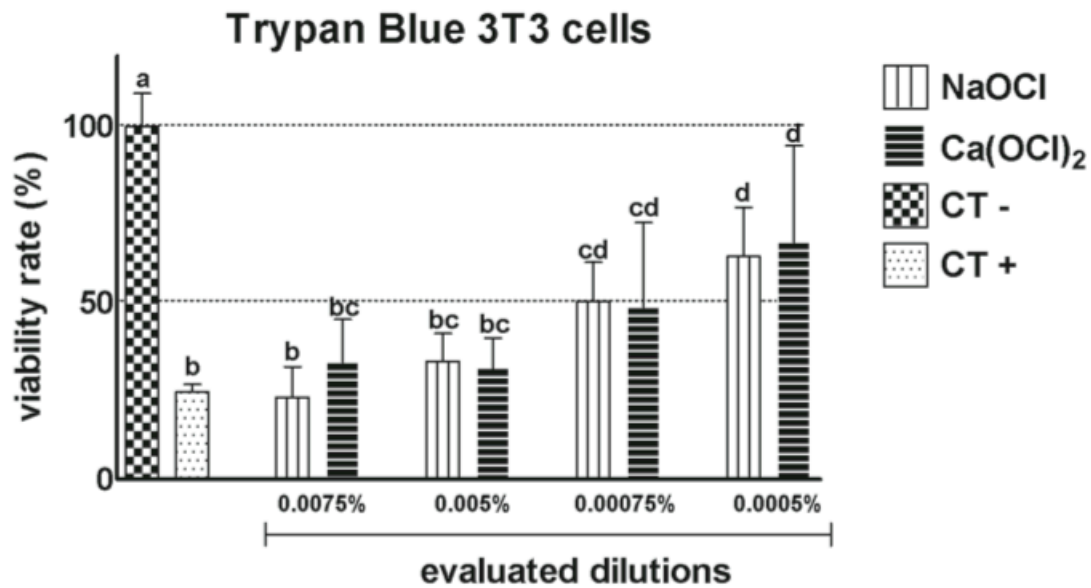


Figure 3: Comparison of cell viability among groups and dilutions in Trypan Blue assay. $P < 0.05$

Biocompatibility assay

Results were summarized in Table 1 and Figure 4.

The presence of neutrophils significantly decreased in 1% Ca(OCl)₂ group between 2h and 24h ($p=0.041$) and between 2h and 14d ($p=0.017$). Sterile saline also showed significant reduction between 2h and 14d ($p=0.024$) and the no irrigant group between 24h and 14d ($p = 0.035$) and between 2h and 14d ($p=0.022$). Eosinophilic cells were detected in one group only (1% Ca(OCl)₂), at the 2h period.

Regarding lymphocytes/plasmocytes and macrophages, there were no statistical significant differences among groups. Giant cells were not observed in any group.

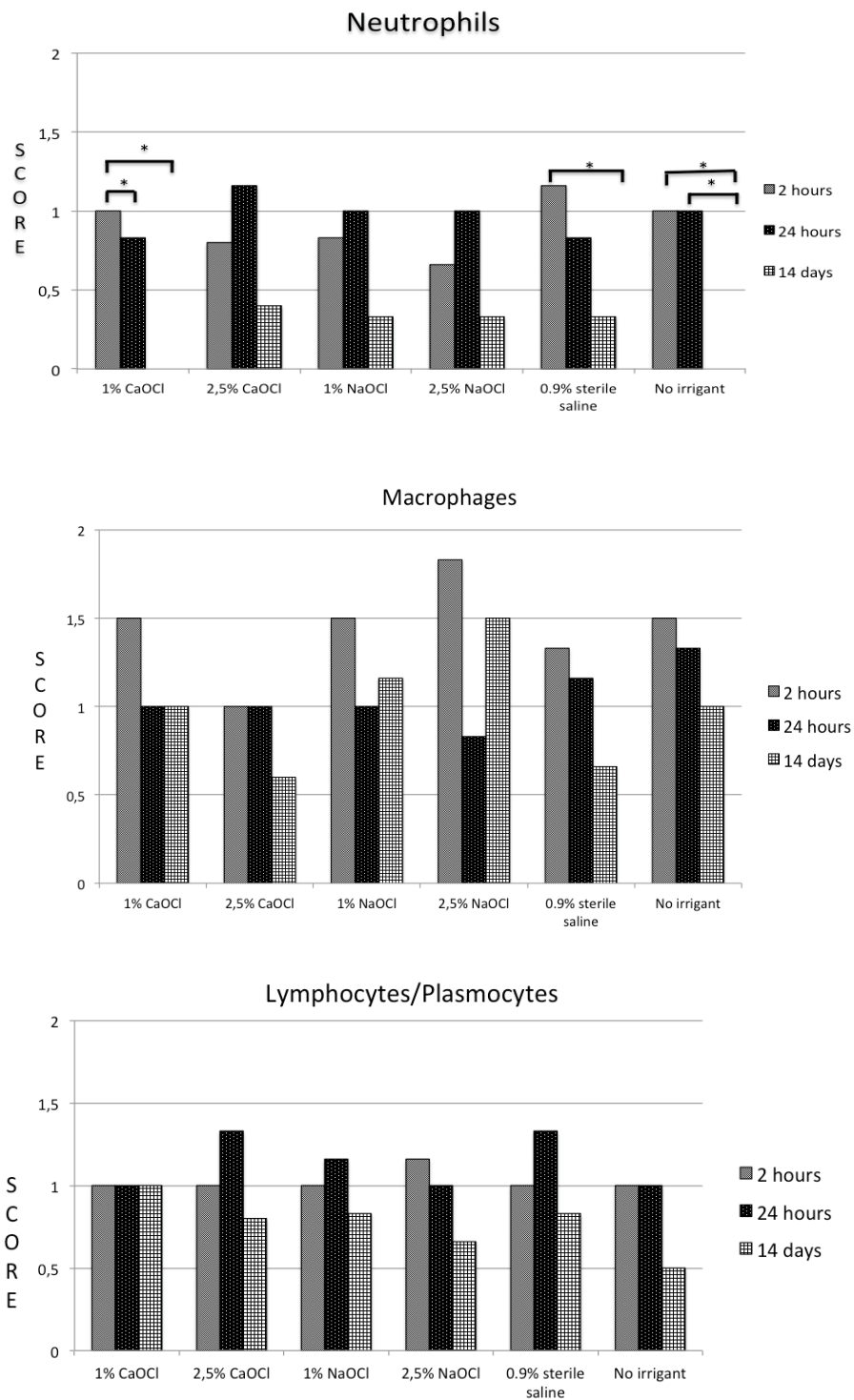


Figure 4. Comparison among groups and periods regarding the variables: neutrophils, lymphocytes/plasmocytes and macrophages. *P<0.05

Table 1: Absolute and Relative Frequencies for Observed Histologic Features according to Periods and Groups.

Scores	1% Ca(OCl) ₂ , n(%)			2.5% Ca(OCl) ₂ , n(%)			1% NaOCl, n(%)			2.5% NaOCl, n(%)			0.9% sterile saline, n(%)			No irrigant, n(%)		
	2h	24h	14d	2h	24h	14d	2h	24h	14d	2h	24h	14d	2h	24h	14d	2h	24h	14d
Neutrophils																		
0	1 (16.7)	1 (16.7)	5 (100)	1 (20)	1 (16.7)	3 (60)	1 (16.7)	1 (16.7)	4 (66.7)	2 (33.3)	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	1 (16.7)	4 (66.7)	0 (0)	1 (16.7)	5 (83.3)
1	4 (66.7)	5 (83.3)	0 (0)	4 (80)	4 (66.7)	2 (40)	5 (83.3)	4 (66.7)	2 (33.3)	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	5 (83.3)	2 (33.3)	6 (100)	6 (100)	4 (66.7)	1 (16.7)
2	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Eosinophils																		
0	5 (83.3)	6 (100)	5 (100)	5 (100)	6 (100)	5 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
1	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Lymphocytes/Plasmocytes																		
0	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	3 (50)
1	4 (66.7)	4 (66.7)	5 (100)	5 (100)	5 (83.3)	3 (60)	6 (100)	5 (83.3)	5 (83.3)	6 (100)	2 (33.3)	6 (100)	4 (66.7)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	4 (66.7)	3 (50)
2	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Macrophages																		
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	2 (33.3)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)
1	4 (66.7)	6 (100)	5 (100)	5 (100)	6 (100)	3 (60)	4 (66.7)	6 (100)	3 (50)	5 (83.3)	3 (50)	2 (33.3)	4 (66.7)	5 (83.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	5 (83.3)	4 (66.7)
2	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	2 (33.3)	0 (0)	1 (16.7)
3	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	2 (33.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)

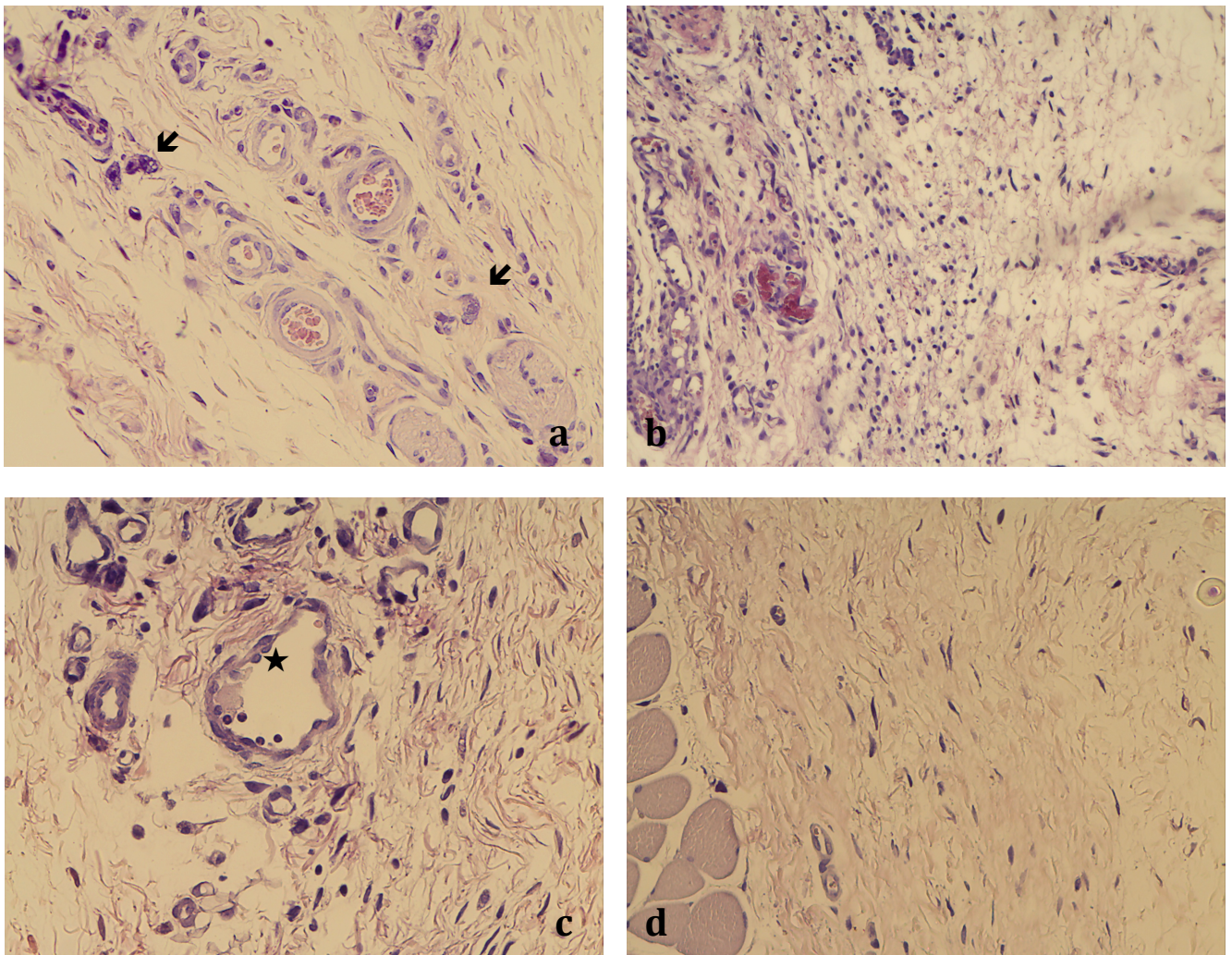


Figure 5: Reaction of rat subcutaneous connective tissue (a) 1% NaOCl at 2h, showing presence of macrophages (→) at 200x; (b) 2.5% Ca(OCl)₂ at 24h, showing high number of inflammatory cells at 100x; (c) no irrigant at 24h, showing start neutrophils rolling (★) at 200x; (d) no irrigant at 14d, showing fibroblasts and absence of inflammatory infiltrate at 200x.

DISCUSSION

An ideal endodontic irrigant must present some characteristics including antimicrobial activity, tissue-dissolving capacity and to induce mild or no inflammatory response in the periapical tissues with minimal toxic effect (3,6,10,16,17). There were no studies that evaluate cytotoxicity and biocompatibility to Ca(OCl)_2 .

Liang et al. (15) described scratch assay and reported that it mimics to some extent migration of cells *in vivo* during a wound healing. This method is based on the creation of a new artificial gap, so called “scratch”, on a confluent cell monolayer. The cells on the edge of the newly created gap will move toward the opening to close the “scratch” until new cell–cell contacts are established again. The basic steps involve creation of a “scratch” on monolayer cells, capture of images at the beginning and regular intervals during cell migration to close the scratch, and comparison of the images to determine the rate of cell migration.

In Endodontics, the main outcome of the treatment is the periapical and apical tissue repair and the chemical solutions used during the therapy can accelerate or retard the healing process (3). In this regards, Ca(OCl)_2 showed more satisfactory results than NaOCl, resembling to the control group. In this sense, Ca(OCl)_2 seem to be more favorable to healing than NaOCl when evaluated the time required to close the scratch in scratch assay.

The Trypan Blue is considered suitable assay to evaluate dental materials cytotoxicity. Trypan Blue is a dye which is absorbed by dead cells due to the loss of its plasmatic membrane selectivity, whereas live cells remain unstained (18).

Many authors assert that the NaOCl cytotoxicity is directly proportional to its concentrations (10,19-24). In Trypan Blue, we confirmed this outcome for both NaOCl and Ca(OCl)_2 , observing an increase of cytotoxicity as the concentration increases. 0.0075% Ca(OCl)_2 group seemed to show a better cell viability than NaOCl at the same concentration. However, only the 0.0005% groups presented viability mean higher than 50% (NaOCl = 63% and Ca(OCl)_2 = 67%).

In the meantime, is very important that the solutions are also evaluated for their *in vivo* behavior. Tests on experimental animals generate results that better represent the clinical situation (25).

The *in vivo* assay showed that 1 and 2.5% Ca(OCl)₂ did not induce intense inflammatory response during the evaluated periods. It also was not more irritating than NaOCl. Sterile saline and no irrigant groups showed a mild inflammatory reaction, which are in agreement with others authors (3,17). Inflammatory reaction in the no irrigant group can be a result of the mechanical trauma caused by the puncture itself.

As well as in Trypan Blue assay, it was observed a tendency of Ca(OCl)₂ to be more toxic as its concentration increased. Possibly, if 5.25% Ca(OCl)₂ had been tested, this fact could be confirmed.

Neutrophils have functions in the acute inflammatory response and are mobile cells with phagocytic action. They appear with greater intensity during shorter experimental periods (26). A statistical difference was found in the reduction of neutrophils over the periods at the following groups: 1% Ca(OCl)₂ (p=0.011), sterile saline (p=0.028) and no irrigant (p=0.011). With these results we can suggest that 1% Ca(OCl)₂ is less aggressive than 2.5% Ca(OCl)₂, 1% and 2.5% NaOCl solutions.

According to chronic response, no significant statistical differences were detected among groups and periods for lymphocytes/plasmocytes and macrophages presence. Macrophages should also be assessed since they are cells that participate in elimination of the agent of aggression, and are capable of provoking tissue destruction by release of oxygenated radicals, enzymes and cytokines (26).

Macrophages were observed in all groups, since, no giant cells were observed, which represent a foreign body reaction characterizing that the presence of material is difficult for the body to break down (26). It suggests that the macrophages were capable to clean the region. So, the solutions used in this

study were eliminated by the initial inflammatory action without inducing a foreign body reaction.

It is important to report that was observed a higher hyperemia in all groups at the 2-hours period, decreasing over time. It can be explained by the reaction to the injected solutions and by the repair process installation.

Pashley et al. (27), injected different concentrations of NaOCl and noted that 5.25% NaOCl generally produced hemorrhage and edema immediately after injections. The same was observed in the present study, by the establishment of edema immediately after injections of 2.5% NaOCl in some sites, but not for Ca(OCl)_2 areas. Although these sites were healthy at the moment of euthanasia, being confirmed histologically, where no edema was observed in any sample tissue. This is a clinically relevant finding, since the extrusion of irrigants beyond the apical constriction is habitual, resulting in direct contact with periapical tissue (28).

Ca(OCl)_2 showed acceptable outcomes of cell migration, viability and level of inflammatory response, presenting results that can qualify it to be used as an irrigant solution in Endodontics.

REFERENCES

1. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. *J Endod* 2010;36:1558–1562.
2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin N Am* 1974;18:269.
3. Önçag O, Hosgör M, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.
4. Guneser MB, Arslan D, Usumez A. Tissue Dissolution Ability of Sodium Hypochlorite Activated by Photon-initiated Photoacoustic Streaming Technique. *J Endod* 2015;41:729–732.

5. Mohammadi Z. Sodium Hypochlorite in Endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008;58:329-341.
6. Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MMT de M, Bernabé PFE. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci.* 2008;16:137-44.
7. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski P, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004;37:272-80.
8. Villas-Bôas MH, Bernardineli N, Cavenago BC, Marciano M, Del Carpio-Perochena A, de Moraes IG, Duarte MH, Bramante CM, Ordinola-Zapata R. Micro-computed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. *J Endod.* 2011;37:1682-6.
9. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Philips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigant. *J Endod* 1995;21:513-5.
10. Spanberg L, Engstrom B, Langeland K, Conn F. Biological effects of dental materials - Part III: toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;36:856 -70.
11. Nicoletti MA, Magalhães JF. Influence of the container and environmental factors in the stability of sodium hypochlorite. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996;121:301-9.
12. Dutta A, Saunders WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on Soft-tissue dissolution. *J Endod* 2012;38:1395-8.
13. Whittaker MA, Mohler BM. The sterilization of milk bottles with calcium hypochlorite. *Am J Public Health* 1912;2:282-7.
14. de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Bello YD, Cecchin D, Farina AP. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* Study. *J Endod* 2014;40:1953-1957.
15. Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2007;2:329-33.

16. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod.* 2006;32:389-98.
17. Türkün M, Gökay N, Özdemir N. Comparative investigation of the toxic and necrotic tissue dissolving effects of different endodontic irrigants. *Istanbul Univ Dishekim Fak Derg* 1998;32:87-94.
18. Marins JSR, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. *In vitro* Genotoxicity and Cytotoxicity in Murine Fibroblasts Exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and Citric Acid. *Braz Dent J* 2012;23: 527-33.
19. Stewart GG, Cobe HM, Rappaport H. A study of a medicament in the chemomechanical preparation of infected root canals. *J Amer Dent Assoc* 1961;63:33-7.
20. Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Amer Dent Assoc* 1936;23:1418-24.
21. Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. *J Amer Dent Assoc* 1941;28:223-5.
22. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects off temperature, concentration, and tissue type on ability of sodium hypochlorite. *J Endod* 1981;7:376-7.
23. Chu GT, Fleury AAP, Murray P, Flax MD. The ability of different concentrations of NaOCl to dissolve and reduce the weight of bovine pulp tissue in vitro. *J Endod* 2004;30:274.
24. Johnson BR, Munaretto R, Chruszczyk A, Daniel J, Begole EA. Tissue solvent activity of high concentration NaOCl on bovine tenden collagen. *J Endod* 2004;30:266.
25. Schmalz G; Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dental Materials*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009.
26. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins pathologic bases of disease*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
27. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effect of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525-8.
28. Tinaz AC, Alacam T, Uzun O, Maden M, Kayaoglu G. The effect of disruption of apical constriction on periapical extrusion. *J Endod* 2005;31:533-5.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação de biocompatibilidade de um material odontológico é um processo complexo que exige a execução de diferentes testes para sua determinação. Os resultados destes testes são dependentes não apenas do material testado como também da metodologia do teste utilizado. Por isso, diferentes metodologias em diferentes níveis devem ser consideradas (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

O primeiro nível a ser testado é *in vitro*, geralmente através do uso de cultura de células, chamados ensaios de citotoxicidade. Esses estudos são considerados simples e fornecem informações importantes que podem ajudar a elucidar os mecanismos de toxicidade celular (MARINS et al., 2012).

Se os experimentos *in vitro* mostrarem resultados promissores, estudos em animais experimentais devem ser executados. O uso de modelos animais é frequentemente usado para avaliação de materiais endodônticos. Esse tipo de estudo permite a avaliação do comportamento dos materiais testados em relação aos tecidos, tornando possível, dentro de certos limites, prever os seus efeitos sobre os tecidos das regiões apicais e periapicais, por exemplo (SCARPARO et al., 2010).

Segundo Senne et al. (2009), a presença de efeito tóxico *in vitro* não significa que o material seja tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência do efeito tóxico *in vitro* é possivelmente a garantia de uma boa resposta clínica. O ensaio de Azul de Trypan mostrou que a citotoxicidade do Ca(OCl)_2 foi diretamente proporcional a sua concentração.

Mesmo não sendo tipicamente um ensaio de citotoxicidade, o ensaio de “scratch” foi escolhido para este estudo por representar, com limitações, o processo de reparo que ocorre na região periapical após o tratamento endodôntico. O intuito em realizar esse ensaio foi avaliar se as soluções irrigadoras testadas poderiam acelerar ou retardar o processo de reparo após a terapia endodôntica quando comparadas com o meio sem nenhuma solução irrigadora. Os resultados desse experimento mostraram-se favoráveis ao hipoclorito de cálcio que apresentou tempo de reparo do “scratch” menor do que o hipoclorito de sódio e semelhante ao grupo controle.

Em relação ao ensaio *in vivo*, as concentrações de 1 e 2.5% testadas apresentaram bom comportamento tecidual, não provocando sinais de inflamação aguda exacerbada, como formação de abscesso e presença de células gigantes.

O hipoclorito de cálcio, no presente estudo, apresentou resultados promissores, no que diz respeito a citotoxicidade e biocompatibilidade. No entanto, outros estudos que avaliem suas propriedades físico-químicas e microbiológicas são necessários para que essa solução possa ser utilizada clinicamente no tratamento de canais radiculares.

5 CONCLUSÃO

Ca(OCl)₂ mostrou desfechos aceitáveis de migração celular, viabilidade e nível de resposta inflamatória, apresentando resultados que podem qualificá-lo como solução irrigadora em Endodontia.

REFERÊNCIAS

ABOU-RASS M, OGLESBY SW. The effects off temperature, concentration, and tissue type on ability of sodium hypochlorite. **J Endod.** v. 7, n. 8, p. 376-7, 1981.

ALKATHANI A, ALKATHANY SM, MAHMOOD A, ELSAFADI MA, ALDAHMAH AM, ANIL S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. **BMC Oral Health.** v. 14, n. 27, p. 1-15, 2014.

AUBUT V, POMMEL L, VERHILLE B, ORSIÈRE T, GARCIA S, ABOUT I, CAMPS J. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 109, p. 120-5, 2010.

AUERBACH MB. Antibiotics vs instrumentation in endodontic. **NY St Dent J.** v. 19, n. 5, p. 225-8, 1953.

BARNHART BD, CHUANG A, LUCCA JJD, ROBERTS S, LIEWEHR F, JOYCE AP. An *in vitro* Evaluation of the Cytotoxicity of Various Endodontic Irrigants On Human Gingival Fibroblasts. **J Endod.** v. 31, n. 8, p. 613-15, 2005.

BUCK RA, CAI J, ELEAZER PD, STAAT RH, HURST HE. Detoxification of Endotoxin by Endodontic Irrigants and Calcium Hydroxide. **J Endod.** v. 27, n. 5, p. 325-7, 2001.

CHU GT, FLEURY AAP, MURRAY P, FLAX MD. The ability of different concentrations of NaOCl to dissolve and reduce the weight of bovine pulp tissue *in vitro*. **J Endod.** v. 30, p. 274, 2004.

CULLEN JKT, WEALLEANS JA, KIRKPATRICK TC, YACCINO JM. The Effect of 8.25% Sodium Hypochlorite on Dental Pulp Dissolution and Dentin Flexural Strength and Modulus. **J Endod.** v. 41, n. 6, p. 920-24, 2015.

DAKIN HD, DUNHAM EK. The relative germicidal efficiency of antiseptics of the chlorine group and acriflavine and other Dyes. **Brit Med J.** v. 2, p. 641-5, 1917.

de ALMEIDA AP, SOUZA MA, MIYAGAKI DC, BELLO YD, CECCHIN D, FARINA AP. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* Study. **J Endod.** V. 40, p. 1953-1957, 2014.

DIMITRIU D, DOBRE T. Effects of Temperature and Hypochlorite Concentration on the Rate of Collagen Dissolution. **J Endod.** v. 41, n.6, p. 903-6, 2015.

DUTTA A, SAUNDERS WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on Soft-tissue dissolution. **J Endod.** v. 38, p. 1395-8, 2012.

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

FERRREIRA MBC, JUNIOR BC, GALAFASSI D, GOBBI DL. Calcium Hypochlorite as a Dentin Deproteinization Agent: Microleakage, Scanning Electron Microscopy and Elemental Analysis. **Microsc Res Tech**. 2015 [Epub ahead of print]

FRAIS S, NG Y-L, GULABIVALA K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. **Int Endod J**. v. 34, n. 1, p. 206-15, 2001.

GERNHARDT CR, EPPENDORF K, KOZLOWSKI P, BRANDT M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. **Int Endod J**. v. 37, p. 272-80, 2004.

GOMES-FILHO JE, AURÉLIO KG, COSTA MMT DE M, BERNABÉ PFE. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. **J Appl Oral Sci**. V. 16, p. 137-44, 2008.

GRIGORATOS D, KNOWLES JC, NG YL, GUABIVALA K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. **Int Endod J**. v. 34, p. 113-19, 2001.

GROSSMAN LI. Irrigation of root canals. **J Amer Dent Assoc**. v. 23, p. 1418-24, 1936.

GROSSMAN LI, MEIMAN BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. **J Amer Dent Assoc**. v. 28, p. 223-5, 1941.

GUNESER MB, ARSLAN D, USUMEZ A. Tissue Dissolution Ability of Sodium Hypochlorite Activated by Photon-initiated Photoacoustic Streaming Technique. **J Endod**. v. 41, p. 729-732, 2015.

HOFFMAN PN, DEATH JE, COATES D. The stability of sodium hypochlorite solution. In: COLLINS CH. **Desinfectants: their use and evaluation of effectiveness**. London: Academic Press; 1991.

JOHNSON BR, MUNARETTO R, CHRUSZCZYK A, DANIEL J, BEGOLE EA. Tissue solvent activity of high concentration NaOCl on bovine tendon collagen. **J Endod**. v. 30, p. 266, 2004.

LEONARDO M, LEONARDO R. **Tratamento de Canais Radiculares: avanços tecnológicos de uma endodontia minimamente invasiva e reparadora**. São Paulo: Artes Médicas, 2012.

LIANG CC, PARK AY, GUAN JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**. v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

MARINS JSR, SASSONE LM, FIDEL SR, RIBEIRO DA. *In vitro* Genotoxicity and Cytotoxicity in Murine Fibroblasts Exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and Citric Acid. **Braz Dent J**. v. 23, n. 5, p. 527-33, 2012.

MARENDING M, PAQUÉ F, FISCHER J, ZEHNDER M. Impact of Irrigant Sequence on Mechanical Properties of Human Root Dentin. **J Endod.** v. 33, n. 11, p. 1325-1328, 2007.

MATSUHIRA T, KAJI C, MURAKAMI S, MAEBASHI K, OKA T, TAKEDA N, KATAYAMA K. Evaluation of Four Antiseptics Using a Novel Murine Norovirus. **Exp. Anim.** V. 61, n. 1, p. 35-40, 2012.

MISURIYA A, BHARDWAJ A, BHARDWAJ A, AGRAWAL S, KUMAR PSP, GAJJAREPU S. A Comparative Antimicrobial Analysis of Various Root Canal Irrigating Solutions on Endodontic Pathogens: An *in vitro* Study. **J Contemp Dent Pract.** v. 15, n. 2, p. 153-160, 2014.

MITTAL M, CHANDRA S, CHANDRA S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **J. Endod.** v. 21, n. 12, p. 622-624, 1995.

MOHAMMADI Z. Sodium Hypochlorite in Endodontics: an update review. **Int Dent J.** v. 58, p. 329-341, 2008.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAVARRO-ESCOBAR E, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ MP, FERRER-LUQUE CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** V. 15, n. 1, p. 90-4, 2010.

NICOLETTI MA, MAGALHÃES JF. Influence of the container and environmental factors in the stability of sodium hypochlorite. **Bol Oficina Sanit Panam.** v. 121, p. 301-9, 1996.

OLSSON B, SLIWKOWSKI A, LANGELAN K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J. Endod.**, v. 7, n. 8, p. 355-367, 1981.

ÖNÇAG O, HOSGÖR M, ZEKIOGLU O, ERONAT C, BURHANOGLU D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. **Int Endod J.** n. 36, p. 423-32, 2003.

PAIVA JG, ANTONIAZZI JH. **Endodontia: Bases para a prática clínica.** São Paulo: Artes Médicas, 1991.

PISKIN B, TÜRKÜN M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. **J Endod.** v. 21, n. 2, p. 253-5, 1995.

SCARPARO RK, FACHIN EVF, GRECCA FS. Methodologies for Preliminary Assessment of the Biocompatibility of Endodontic Materials in Connective Tissue: a review. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre.** v. 50, n. 3, p. 32-5, 2010.

SCHILDER H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin N Am.** v. 18, p. 269, 1974.

SCHMALZ G; ARENHOLT-BINDSLEV D. **Biocompatibility of Dental Materials.** Berlin: Springer Science & Business Media, 2009. 379 p.

SENNE MI, LEMOS N, FIDEL SR, FIDEL RAS. Evaluation of the cytotoxicity of three root canal sealers used in obturation of radicular canals system. **RSBO.** v. 6, n. 1, p. 71-76, 2009.

SIM TPC, KNOWLES JC, NG YL, SHELTON J, GUABIVALA K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. **Int Endod J.** v. 34, p. 120-132, 2001.

SIMBULA G, DETTORI C, CAMBONI T, COTTI E. Comparison of Tetraacetylenediamine + Sodium Perborate and Sodium Hypochlorite Cytotoxicity on L929 Fibroblasts. **J Endod.** v. 36, n. 9, p. 1516-20, 2010.

STEWART GG, COBE HM, RAPPAPORT H. A study of a medicament in the chemomechanical preparation of infected root canals. **J Amer Dent Assoc.** v. 63, p. 33-7, 1961.

STOJICIC S, ZIVKOVIC S, QIAN W, ZHANG H, HAAPASALO M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. **J Endod.** v. 36, p. 1558-1562, 2010.

TÜRKÜN M, GÖKAY N, ÖZDEMİR N. Comparative investigation of the toxic and necrotic tissue dissolving effects of different endodontic irrigants. **Istanbul Univ Dishekim Fak Derg.** v. 32, p. 87-94, 1998.

TWOMEY JO, ABDELAZIZ KM, COMBE EC, ANDERSON DL. Calcium hypochlorite as a disinfecting additive for dental stone. **J Prosthet Dent.** v. 90, p. 282-8, 2003.

UROZ-TORRES D, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ MP, FERRER-LUQUE CM. Effectiveness of the EndoActivator System in Removing the Smear Layer after Root Canal Instrumentation. **J Endod.** v. 36, n. 2, p. 308-311, 2010.

WHITTAKER MA, MOHLER BM. The sterilization of milk bottles with calcium hypochlorite. **Am J Public Health.** v. 2, p. 282-7, 1912.


YESILSOY C, WHITAKER E, CLEVELAND D, PHILIPS E, TROPE M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigant. **J Endod.** v. 21, p. 513-5, 1995.

ZEHNDER M. Root Canal Irrigants. **J Endod.** v. 32, n. 5, p. 389-98, 2006.

ZHANG W, TORABINEJAD M, LI Y. Evaluation of Cytotoxicity of MTAD Using the MTT-Tetrazolium Method. **J Endod.** v. 29, n 10, p 654-57, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e Comissão em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (COMPESQ)

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

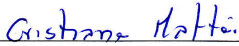
Número: 26012
Título: ANALISE HISTOLOGICA DE SOLUCOES IRRIGADORAS EM DIFERENTES CONCENTRACOES EM TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

FABIANA SOARES GRECCA VILELLA - coordenador desde 01/12/2013
FRANCISCO MONTAGNER - coordenador desde 01/12/2013
ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - pesquisador desde 01/12/2013
GABRIELA BESS FERRAZ BLATTES - pesquisador desde 01/12/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 24/03/2014 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Prédio da Reitoria - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 24 ratos Wistar, machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 4 de Abril de 2014



CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética

As soluções irrigadoras empregadas durante o preparo químico-mecânico dos canais radiculares em um tratamento endodôntico possuem um papel fundamental para o sucesso do tratamento. Entre as características mais importantes que uma solução irrigadora deve ter estão a sua biocompatibilidade e capacidade de dissolução tecidual. O objetivo do presente trabalho é avaliar a reação de diferentes concentrações de soluções irrigadoras em tecido conjuntivo e ósseo de ratos. As soluções testadas serão: hipoclorito de sódio a 1% e a 2,5%, hipoclorito de cálcio a 1% e a 2,5% e soro fisiológico (controle). Para avaliar a reação tecidual em tecido conjuntivo de ratos, serão utilizados 24 ratos Wistar, divididos em 4 grupos experimentais, de acordo com o tempo de observação após intervenção: 2 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias. As soluções irrigadoras serão injetadas no dorso dos ratos sob anestesia geral. Após os períodos experimentais, os ratos serão anestesiados e eutanasiados em câmara de CO₂ previamente saturada. As amostras teciduais obtidas serão preparadas e analisadas histologicamente em microscópio óptico, nos aumentos de 40x, 100x e 400x. Serão descritos os elementos inflamatórios encontrados e determinado a sua proporção no conjunto de eventos. Para análise estatística, no caso de distribuição normal, será utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida de post-hoc (Tukey). Se a distribuição não for normal, será utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

O presente projeto possui mérito científico, encontra-se bem delineado e contempla princípios metodológicos como cálculo amostral, grupo controle e cegamento. Somos pela aprovação. O projeto deverá ser encaminhado ao Comitê de ética no Uso de Animais.

ANEXO 2: Carta de aprovação da Comissão em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (COMPESQ)

Projeto: 26578

Título: CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS

Coordenador: FABIANA SOARES GRECCA VILELLA

Este estudo tem o objetivo de avaliar a biocompatibilidade do hipoclorito de cálcio através do estudo da citotoxicidade e genotoxicidade desse composto em comparação com o hipoclorito de sódio. Para isso serão realizados diferentes testes in vitro utilizando cultura de células de fibroblastos de ratos 3T3. Os testes realizados serão: MTT (brometo de 3-[4,5-imetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium), SRB (uso da proteína sulforodamina B), avaliação da morfologia celular através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teste de Micronúcleo, teste Cometa e teste ELISA. Os grupos testes serão o hipoclorito de cálcio 2,5% e hipoclorito de sódio 2,5% ambos nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Também serão utilizados dois grupos controle negativo: o grupo sem células e com o meio de cultura (branco) e o grupo com células e sem as substâncias teste. Os autores adequaram o projeto e encontra-se bem descrito e delineado. Portanto somos pela aprovação.