

## Efeito do estímulo de substâncias liberadas por cimentos endodônticos sobre macrófagos em cultura\*

### *Effect of stimulation by substances leached from endodontic sealers on macrophages cells in culture*

Lorena Ribeiro de Sousa\*\*  
Bruno das Neves Cavalcanti\*\*\*  
Carlos Eduardo Aun\*\*\*\*  
Márcia Martins Marques\*\*\*\*

#### Resumo

**Introdução** – O selamento biológico dos canais radiculares, almejado pelo tratamento endodôntico, depende não somente dos passos operatórios e substâncias utilizadas nesse processo, mas também do sistema imune do paciente. Portanto, o objetivo desse trabalho in vitro foi analisar a viabilidade de macrófagos previamente ativados com interferon-gama (IFN-g) e lipopolissacarídeo (LPS) e estimulado por substâncias liberadas por 3 cimentos endodônticos. **Material e Métodos** – Meio de cultura foi condicionado por cimentos comumente utilizados em Endodontia (à base de óxido de zinco e eugenol, resinoso e à base de hidróxido de cálcio) durante 1 h ou 24 h. Macrófagos foram obtidos de líquido de ascite do peritônio de camundongos e semeados em 42 poços (2 x 105 células/poço) em placas de 96 poços. Após a ativação com IFN-g e LPS de E.coli a mensuração da citotoxicidade de substâncias liberadas dos cimentos foi obtida através do teste da redução do MTT. A absorvância dos poços foi lida em espectrofotômetro usando um filtro de 562 nm. Os dados de seis réplicas foram comparados pelo teste estatístico de Friedman. O nível de significância foi de 5%. **Resultados** – A viabilidade de células controle e das tratadas pelas substâncias liberadas pelos cimentos foi similar. Os grupos tratados com o cimento de óxido de zinco e eugenol apresentaram diferenças significantes na viabilidade celular. A viabilidade de células tratadas com meios condicionados por 1h foi menor do que o daquela de células tratadas com meio condicionado por 24h. **Conclusão** – Independentemente do tempo de condicionamento (1h ou 24h) as substâncias liberadas durante a presa dos cimentos endodônticos testados não foram citotóxicas aos macrófagos peritoniais de camundongos ativados e em cultura

Palavras-chave: Cultura de células; Cimentos endodônticos; Macrófagos

#### Abstract

**Introduction** – The biological sealing of the dental root canals, aimed by the endodontic therapy, depends not only on the operatory steps and substances used in this process but also on the immune system of the patient. Thus, the objective of this in vitro study was to analyze the viability of macrophages previously activated by interferon-gama (IFN-g) and lipopolisaccharide (LPS) and stimulated by substances leached from three endodontic sealers. **Material and Methods** – Culture media was conditioned by commonly used endodontic sealers (zinc oxide-eugenol based, resinous, and, calcium hydroxide based) during 1h or 24h. Macrophages were obtained from peritoneal inflammatory liquid and then seeded into 42 wells (2 x 105 cells/well) in 96 wells microtitration plates. After activation with IFN-g and LPS from E.coli the measurement of the cytotoxicity of the substances leached from the sealers was obtained through the MTT reduction assay. The absorbance of the wells was read in a spectrophotometer using a 562 nm filter. The data of six replicates were compared by the Friedman's test. The level of significance was 5%. **Results** – The cell viability of control cells and cells treated by the substances leached from the endodontic sealers were similar. The groups treated with the zinc oxide-eugenol based sealer presented significant differences in cell viability; the viability of cells from the 1h group was significantly smaller than that of the 24h group. **Conclusion** – Independently of the conditioning time (1h or 24h) the substances leached from the endodontic sealers tested during their settings are non cytotoxic to mice peritoneal activated macrophages in culture.

Key words: Cell culture; Endodontic sealers; Macrophages

\* Parte da Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), 2006.

\*\* Doutora em Endodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). E-mail: lores1810@uol.com.br

\*\*\* Professor Assistente Doutor do Curso de Pós-graduação em Biodontologia da Universidade Ibirapuera (Unib).

\*\*\*\* Professores Associados do Departamento de Dentística da FOUSP.

## Introdução

O tratamento endodôntico busca restabelecer as condições de normalidade dos dentes pela eliminação de microrganismos e seus produtos, remoção de tecido lesado, sanificação e obturação do sistema de canais radiculares<sup>9</sup>.

O selamento apical biológico objetivado pela Endodontia, com auxílio, dentre outros, dos materiais obturadores tanto à base de óxido de zinco e eugenol quanto de epóxi-resina ou de hidróxido de cálcio nem sempre é conseguido com sucesso. Isso porque, a regeneração dos tecidos periapicais e a sintomatologia pós-operatória apresentada pelo paciente dependem da resposta inflamatória do periodonto apical, em função do tratamento, cabendo considerar ainda, a citotoxicidade dos materiais utilizados<sup>9</sup>.

Na complementação do tratamento endodôntico cimentos obturadores entram em contato com os tecidos do periápice, condição propícia para manter a inflamação sob forma crônica localizada, podendo gerar aumento de casos com dor pós-operatória nos primeiros momentos da conclusão do tratamento do canal radicular não só como retardar a reparação<sup>6,14</sup>. Quando da obturação dos canais radiculares, células inflamatórias, em especial os macrófagos, presentes no periápice, também sofrem os efeitos de substâncias liberadas durante a presa dos cimentos endodônticos.

Essas células do sistema imune são responsáveis pela remoção de células mortas e seus produtos, fagocitose e desbridamento, removendo tecidos danificados, pela ingestão e processamento de antígenos para reconhecimento dos linfócitos, pela liberação de produtos ativadores ou co-estimulatórios para outras células como, linfócitos T e B, e, para os próprios macrófagos, e são a primeira linha de defesa contra certos microrganismos (ex: *Mycobacterium tuberculosis*)<sup>19, 24</sup>.

Em vista do importante papel dos macrófagos na reparação após o tratamento endodôntico e do conhecimento da possibilidade dessas células não só entrarem em contato direto, mas também receberem influência de substâncias liberadas durante a presa dos cimentos endodônticos, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dessas substâncias sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais em cultura.

## Material e Métodos

### Preparo dos cimentos

Três tipos de cimentos endodônticos foram usados, a saber: cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Pulp Canal Sealer EWT, Kerr, Romulus, Michigan, EUA), um cimento resinoso (AH-Plus, Dentsply DeTrey, Konstanz, Suíça), e, à base de hidróxido de cálcio (Sealapex, Kerr, Romulus, Michigan, EUA). Estes materiais foram preparados seguindo as instruções dos fabricantes.

### Condicionamento do meio de cultura

Meio de cultura RPMI-1640 (CultiLab, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bo-

vino foi colocado em contato com cada cimento endodôntico durante suas presas e incubados na temperatura de 37°C, de acordo com as normas da International Standard Organization (ISO 74075)<sup>4</sup>. A quantidade de 0,2 g de cada cimento foi usada para cada ml de meio de cultura para obtenção de meio condicionada que mais tarde foram diluídos a 10% antes de entrar em contato com os macrófagos. Dois tempos de condicionamento foram analisados: 1h e 24h.

### Obtenção dos macrófagos

Seis camundongos machos BALB/c, com seis a oito semanas de idade foram utilizados. Os animais foram tratados de acordo com as Normas de Cuidados de Animais da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais – da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O método escolhido para a obtenção dos macrófagos foi o desenvolvido por Metzger *et al.*<sup>7</sup> (1997), usado por Sousa e Aun<sup>11</sup> (2003) e com modificações propostas por Rodríguez *et al.*<sup>8</sup> (2003).

Os camundongos foram injetados com 1ml de solução a 5% de tioglicolato de sódio (Merck, Alemanha) esterilizado na cavidade peritoneal. Depois de cinco dias, foi feita a ortotanásia dos camundongos, e 5ml de solução tampão salina sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (PBSA) (4°C) foram injetados na cavidade peritoneal. Após massagem no abdômen do camundongo, a suspensão celular foi colhida por aspiração do PBSA e transferida para tubos de ensaio. Uma amostra deste *pool* de células peritoneais (0,2 ml) foi usada para identificação das células usando a coloração de May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld<sup>9</sup> (1947). A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer usando o método de exclusão de células coradas pelo violeta cristal (0,05% do corante violeta cristal dissolvida em solução a 3% de ácido acético)<sup>8</sup>.

Depois da contagem, 2 x 10<sup>5</sup> células/poço foram plaqueadas em 42 poços em placas de 96 poços (de acordo com os grupos experimentais). As placas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C *overnight*. Então, os poços foram lavados três vezes com PBSA para remoção das células não aderentes. Depois, meio RPMI 1640 fresco foi colocado nos poços e as placas foram mantidas em incubação até o momento dos experimentos.

### Análise de viabilidade celular

A toxicidade dos três cimentos endodônticos foi medida *in vitro*. A resposta dos macrófagos, previamente ativados com interferon-gama (IFN-γ) e lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli* (ambos de Sigma, St. Louis, MO, EUA), e estimulados com as substâncias liberadas dos três cimentos endodônticos (à base de óxido de zinco e eugenol, resinoso e à base de hidróxido de cálcio) no meio condicionado, foi analisada. A viabilidade celular foi feita pelo método de redução do MTT (Vibrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) depois do contato com essas substâncias.

### Grupos experimentais

Sete grupos foram estabelecidos:

Controle: tratado com meio fresco

MCA 1h: tratado com meio condicionado durante 1h por cimento endodôntico resinoso

MCS 1h: tratado com meio condicionado durante 1h por cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio

MCP 1h: tratado com meio condicionado durante 1h por cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol

MCA 24h: tratado com meio condicionado durante 24h por cimento endodôntico resinoso

MCS 24h: tratado com meio condicionado durante 24h por cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio

MCP 24h: tratado com meio condicionado durante 24h por cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol

### Análise da citotoxicidade pela redução do MTT

Quarenta e dois poços (6 poços/grupo) em cada placa de 96 poços contendo os macrófagos ativados ( $2 \times 10^5$  células/poço) tiveram os meios de cultura trocados por meios condicionados para cada grupo experimental ou meio de cultura fresco para o grupo controle. O meio condicionado foi aplicado nas células e depois do período de 1h foi trocado por meio de cultura RPMI 1640 fresco. Então, a análise da atividade mitocondrial celular foi feita usando o teste de redução do MTT. Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de  $\approx 570$  nm. Um *Kit* de análise de redução do MTT foi usado. Imediatamente ao final dos procedimentos de análise a leitura da absorbância foi feita usando leitora ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) com filtro de 562 nm.

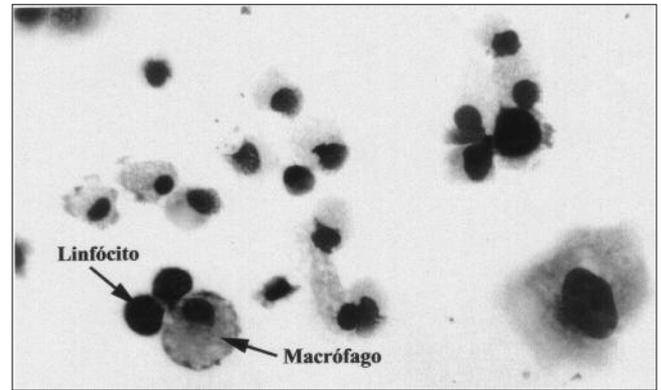
### Análise estatística

Os dados apresentados como média  $\pm$  o erro padrão da média das densidades ópticas, obtidos de seis réplicas, correspondendo à viabilidade celular, foram analisados. Os dados foram comparados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov seguido pelo teste de Friedman. O nível de significância foi 5% ( $P \leq 0.05$ ).

## Resultados

### Identificação dos macrófagos peritoneais

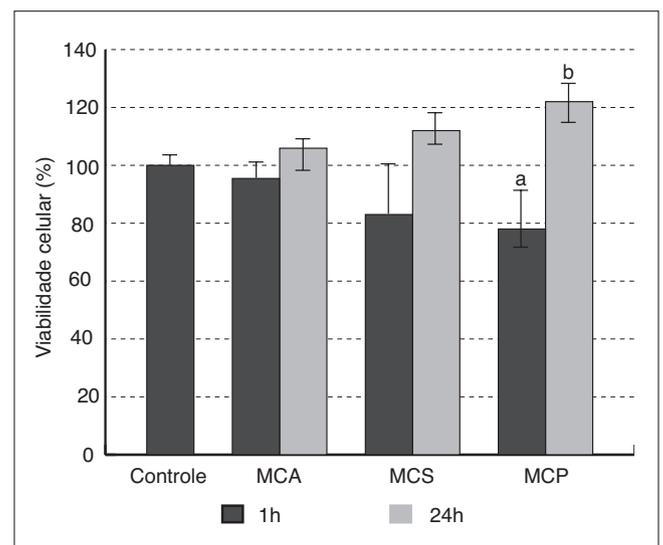
Usando a coloração de May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld foi possível identificar a população celular do líquido inflamatório obtido das cavidades peritoneais dos camundongos. Antes da remoção das células não aderentes, a maioria das células apresentou morfologia de macrófagos, mas outros tipos de células mononucleares também estavam presentes (Figura 1).



**Figura 1.** Identificação das células inflamatórias do líquido obtido de inflamação peritoneal de camundongos (coloração de May-Grünwald e Giemsa modificada por Rosenfeld; x 400).

### Análise da citotoxicidade

Os dados das densidades ópticas dos grupos experimentais foram transformados em porcentagem em relação ao controle considerado como 100%. O Gráfico 1 representa a porcentagem média  $\pm$  o erro padrão da média dos grupos experimentais. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com meio condicionado pelos diferentes cimentos endodônticos e o grupo controle. A única diferença observada foi entre os grupos tratados com meio condicionado com cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol durante 1 h contra o de 24 h. Os grupos tratados com o cimento de óxido de zinco e eugenol apresentaram diferenças significantes na viabilidade celular. A viabilidade de células tratadas com meios condicionados por 1h foi menor do que daquela de células tratadas com meio condicionado por 24 h ( $p \leq 0.05$  – Tabela 1).



**Gráfico 1.** Porcentagens das médias  $\pm$  o erro padrão da média da viabilidade de macrófagos nos diferentes grupos experimentais. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 1. Teste de Friedman para análise da redução do MTT**

	Controle	MCA 1h	MCA 24h	MCS 1h	MCS 24h	MCP 1h	MCP 24h
Soma dos ranks	22	18	26	20	33	12	37
Mediana	101,65	94,03	109,60	94,48	113,90	76,60	121,85
Média dos ranks	3,66	3	4,33	3,33	5,5	2	6,16
Média dos valores	100	94,66	103,93	86,35	110,41	78,21	120,49
Desvio padrão	10,56	15,55	15,5	34,19	14,04	26,32	16,32
Friedman (Fr)	16,21						
Graus de liberdade	6						
(p)	0,01						

## Discussão

Cimentos endodônticos podem alterar o processo inflamatório periapical depois da obturação do sistema de canais radiculares através do contato direto com o tecido periapical se ocorrer extravasamento, ou indireto quando as substâncias liberadas pelos cimentos endodônticos durante sua presa alcançam este tecido. É sabido que macrófagos são células do infiltrado inflamatório responsáveis pela remoção de células mortas ou morrendo, tecidos danificados e partículas de materiais dos tecidos afetados<sup>15</sup>. Por esse motivo este estudo objetivou avaliar a influência das substâncias liberadas por cimentos endodônticos na viabilidade de macrófagos *in vitro*.

Há diversos métodos para se realizar os testes de citotoxicidade de biomateriais. Escolheu-se usar o meio condicionado<sup>2</sup> porque esse método é especialmente importante quando ocorre o contato direto dos materiais analisados com os tecidos periapicais, uma vez que esse é um meio ambiente úmido na prática clínica. Então, no contato com esse tecido úmido, o processo de presa dos cimentos pode ser atrasado, permitindo a liberação de substâncias que poderiam influenciar na reparação do tecido periapical. Usando a técnica do meio condicionado, a situação clínica é mimetizada e a presa do cimento endodôntico é feita em ambiente úmido, tornando o estudo relevante para a clínica odontológica.

Substâncias liberadas dos cimentos endodônticos mais comumente utilizados (à base de óxido de zinco e eugenol, resinoso, e, à base de hidróxido de cálcio) foram colocados em contato com macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*. Em estudo anterior, grupos de meios condicionados provaram ser altamente citotóxicos<sup>2</sup>. Assim, decidiu-se trabalhar com o meio condicionado diluído a 10%, no intuito de tornar o estudo comparativo possível. Essa diluição é apropriada, já que no tecido, o número de células é bem maior do que o número de células nos poços de cultura. Além do mais, vasos sanguíneos e linfáticos estão presentes no tecido *in vivo*, diluindo as substâncias, diferentemente do que acontece no modelo de cultura celular.

Dois tempos de condicionamento foram testados: 24h para seguir a recomendação ISO e 1h para simular a situação clínica, já que é mais freqüentemente observada

durante as primeiras horas após a obturação<sup>14</sup>.

A toxicidade de três cimentos endodônticos foi medida *in vitro* utilizando macrófagos obtidos de líquido inflamatório peritoneal de camundongos. Essas células, depois da caracterização morfológica, foram ativadas por produtos bacterianos, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli*<sup>8</sup>. Essa ativação foi feita porque é sabido que macrófagos ativados respondem diferentemente daqueles não ativados. Para simular a situação clínica foi decidido trabalhar-se com macrófagos ativados, porque na maioria das vezes quando um tratamento endodôntico é necessário, bactérias e/ou seus produtos vindos dos sistemas de canais radiculares já ativaram os macrófagos no tecido periapical. Então, o cimento endodôntico e/ou substâncias liberadas desses serão processados por macrófagos ativados.

Utilizando o teste de redução do MTT foi possível observar que as substâncias liberadas dos cimentos endodônticos testados não foram tóxicas para os macrófagos ativados, porque as viabilidades celulares das culturas tratadas com os meios condicionados foram similares àquelas das células das culturas controle, independentemente do tempo de condicionamento.

Corroborando com este estudo, Mendes *et al.*<sup>8</sup> (2003) estudaram o efeito de dois cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, recém preparados ou após a presa em 24h, em culturas *in vitro* de macrófagos obtidos de camundongos e mostraram ausência de efeito na viabilidade celular. Demarco *et al.*<sup>9</sup> (2001) também mostraram que hidróxido de cálcio é biocompatível *in vitro*. Por outro lado, outros estudos de citotoxicidade de cimentos endodônticos *in vitro* apresentaram resultados opostos aos encontrados aqui, com cimentos resinoso e à base de óxido de zinco e eugenol apresentando citotoxicidade<sup>10,16</sup>. Entretanto, esses autores utilizaram outros tipos celulares. De fato macrófagos parecem ser mais resistentes a materiais estranhos do que células mesenquimais, como fibroblastos<sup>12</sup> e células epiteliais<sup>16</sup>. Além do mais, nesses estudos os cimentos foram colocados em contato direto com as células.

Quando comparando os grupos levando em conta o tempo de condicionamento, uma observação interessante foi feita nos grupos tratados com cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol. Embora am-

bos os grupos (1h e 24h) tenham apresentado viabilidade celular similar ao grupo controle, a viabilidade celular das culturas tratadas com meio condicionado por menor tempo (1h) foi significativamente menor do que aquela observada nas culturas tratadas com meio condicionado por 24h. Este achado pode ser explicado pela presença do eugenol nesse cimento, uma conhecida e sabida substância tóxica, que provavelmente estava mais concentrada na primeira hora durante o período de presa, mas sua concentração diminuiu em 24h depois que o cimento completou sua presa deixando o eugenol incorporado ao cimento e menos disponível para o meio.

Este estudo mostrou que macrófagos ativados *in vitro* são resistentes a substâncias liberadas por cimentos endodônticos comumente utilizados. Entretanto, embora mostrando atividade mitocondrial, ou viabilidade celular, similar às células do grupo controle esses macrófagos poderiam ter alguma de suas funções alteradas por essas substâncias. De fato, já demonstraram que o cimento à base de óxido de zinco e eugenol tem efeito inibitório

em respostas efetivas medidas, como capacidade fagocitária e produção de óxido nítrico<sup>6</sup>. Assim, novos estudos devem ser feitos para melhor compreensão dos efeitos dos cimentos endodônticos nos tecidos periapicais.

### Conclusão

Com base nas condições deste estudo, conclui-se que independentemente do tempo de condicionamento (1h ou 24h) as substâncias liberadas durante a presa dos cimentos endodônticos testados não foram citotóxicas aos macrófagos peritoniais de camundongos ativados e em cultura.

### Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP pelo apoio financeiro oferecido para a realização deste estudo (Processo nº 04/08326-3).

### Referências

1. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod.* 2003; 29(9):583-6.
2. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9.
3. Demarco FF, Tarquínio SBC, Jaeger MMM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* 2001;32:211-20.
4. International Standard Organization. ISO 7405. Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. Geneva; 1997.
5. Larsen GL, Henson PM. Mediators of inflammation. *Ann Rev Immunol.* 1983; 1:335-59.
6. Mendes STO, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, de Souza Cortes MI, Vieira LQ. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod.* 2003 Feb;29(2):95-9.
7. Metzger Z, Berg D, Dotan M. Fibroblast growth *in vitro* suppressed by LPS-activated macrophages. Reversal of suppression by cortisone. *J Endod.* 1997;23(8):517-21.
8. Rodríguez D, Keller AC, Fraquim-Mauro EL, Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol.* 2003;171:1001-8.
9. Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreômicos e estudos de diversos fatores. *Mem Inst Butantan.* 1947;20:315-28.
10. Schwarze T, Fielder I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002;28(11):784-6.
11. Sousa LR, Aun CE. Obtenção de macrófagos ativados para trabalhos científicos. *Rev Odontol UNICID.* 2003;15(3):165-72.

12. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Efeito de substâncias liberadas por cimentos endodônticos distintos na atividade mitocondrial de fibroblastos de polpa. *Braz Oral Res.* 2005;19(Suppl):164.
13. Sousa LR, Lauretti LGB, Guimarães JLH, Abrão CV, Bombana AC. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos: Sealer 26, AH-Plus e do novo sistema resinoso de obturação – Epiphany. *RPG Rev Pós-Grad.* 2004;11(3):285.
14. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:89-96.
15. Trowbridge HO, Emling RC. *Inflammation- a review of the process.* 5th ed. Carol Stream: Quintessence; 1997.
16. Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod.* 2000;26(12):703-7.

Recebido em 14/01/2006

Aceito em 20/3/2006

## Effect of stimulation by substances leached from endodontic sealers on macrophages cells in culture\*

Lorena Ribeiro de Sousa\*\*  
Bruno das Neves Cavalcanti\*\*\*  
Carlos Eduardo Aun\*\*\*\*  
Márcia Martins Marques\*\*\*\*

### Abstract

**Introduction** – The biological sealing of the dental root canals, aimed by the endodontic therapy, depends not only on the operatory steps and substances used in this process but also on the immune system of the patient. Thus, the objective of this *in vitro* study was to analyze the viability of macrophages previously activated by interferon-gama (IFN-g) and lipopolisaccharide (LPS) and stimulated by substances leached from three endodontic sealers. **Material and Methods** – Culture media was conditioned by commonly used endodontic sealers (zinc oxide-eugenol based, resinous, and, calcium hydroxide based) during 1h or 24h. Macrophages were obtained from peritoneal inflammatory liquid and then seeded into 42 wells (2 x 10<sup>5</sup> cells/well) in 96 wells microtitration plates. After activation with IFN-g and LPS from *E.coli* the measurement of the cytotoxicity of the substances leached from the sealers was obtained through the MTT reduction assay. The absorbance of the wells was read in a spectrophotometer using a 562 nm filter. The data of six replicates were compared by the Friedman's test. The level of significance was 5 %. **Results** – The cell viability of control cells and cells treated by the substances leached from the endodontic sealers were similar. The groups treated with the zinc oxide-eugenol based sealer presented significant differences in cell viability; the viability of cells from the 1h group was significantly smaller than that of the 24h group. **Conclusion** – Independently of the conditioning time (1h or 24h) the substances leached from the endodontic sealers tested during their settings are non cytotoxic to mice peritoneal activated macrophages in culture.

*Key words:* Cell culture; Endodontic sealers; Macrophages

### Introduction

The biological sealing of the dental root canals, aimed by the endodontic therapy, depends not only on the operatory steps and substances used in this process but also on the immune system of the patient. The tissue response can be related to the cytotoxicity of the materials used in the endodontic treatment<sup>14</sup>.

After root canal obturation, the endodontic sealers will make direct or indirect contact with the periapical tissues. These conditions could be responsible for the maintenance of the chronic inflammation at the periapical tissues, which can generate immediate post-operatory pain and retardation of the apical regeneration<sup>5,14</sup>.

Substances leached from endodontic sealers during their settings can reach the periapical tissues and can stimulate inflammatory cells, especially macrophages. These cells are the primary line of defense against certain microorganisms, they are also responsible for the ingestion and processing of antigen for presentation to the T cells. Macrophages also remove dead and dying cells, damaged tissues and particulate materials in the foreign body reaction<sup>5,15</sup>.

Due to the important role of macrophages in the regeneration of the periapical tissues after the endodontic treatment and knowing that they will make contact with

endodontic sealers or substances leached from them, this study aimed to evaluate the influence of these substances on the viability of macrophages *in vitro*.

### Material and Methods

#### Endodontic sealers

Three types of endodontic sealers were used, as follows: zinc oxide-eugenol based (Pulp Canal Sealer EWT, Kerr, Romulus, Michigan, USA), resinous (AH-Plus, Dentsply DeTrey, Konstanz, Swiss), and, calcium hydroxide (Sealapex, Kerr). These materials were prepared following the manufacture's instructions.

#### Media conditioning

RPMI-1640 medium (CultiLab, Campinas, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab) was placed in contact with each of the endodontic sealers during their settings and left in an incubator at 37°C, according to instructions of the International Standard Organization (ISO 74075)<sup>4</sup>. The amount of 0.2 g of each sealer was used per each ml of the culture medium to obtain the conditioned media that were later diluted to 10%

\* PhD Thesis presented at School of Dentistry, University of São Paulo, 2006.

\*\* PhD in Endodontics. E-mail: lores1810@uol.com.br

\*\*\* Assistant Professor, DDS, PhD, Biodentistry Post-Graduation Program, Ibirapuera University, São Paulo, Brazil.

\*\*\*\* Associate Professor, DDS, PhD, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

before entering in contact with the macrophages. Two conditioning times were tested: 1h and 24h.

### Macrophages sampling

Six male BALB/c mice, 6- to 8-week-old were used. They were treated according to the Animal Welfare Guidelines of the Federal University of Sao Paulo (UNIFESP). The University of São Paulo, School of Dentistry Research Ethical Committee, approved this study. The method chosen to obtain macrophages was developed by Metzger *et al.*<sup>7</sup> (1997), used by Sousa and Aun<sup>11</sup> (2003) and modified by Rodríguez *et al.*<sup>8</sup> (2003).

The mice were injected into the peritoneal cavity with 1ml of 5% sterile sodium thioglycollate (Merck, Germany). After five days, the mice were killed, and 5ml of a cold Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-free phosphate buffered saline solution (PBSA) was injected into the peritoneal cavity. After a gentle massage of the abdomen, a cell suspension was harvested by aspiration of the PBSA and transferred to a test tube. A sample of this pool of peritoneal cells (0.2 ml) was used for identification of the cells using the May-Grünwald and Giemsa staining modified by Rosenfeld<sup>9</sup> (1947). The cell counting was done in a Neubauer chamber using the crystal violet dye exclusion assay (0.05% crystal violet dissolved into 3% acetic acid)<sup>8</sup>.

After counting, 2 x 10<sup>5</sup> cells/well were plated into 96-well microtitration plates (according to the experimental groups). The plates were incubated in a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C overnight. Then, the wells were washed three times with PBSA solution for removing the non adherent cells. After replacement of the RPMI 1640 the plates were maintained in the incubator until the time of the experiments.

### Cell viability assay

The toxicity of three endodontic sealers was measured *in vitro*. The response of macrophages previously activated by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and lipopolysaccharide (LPS) from *E.coli* (both from Sigma, St. Louis, MO, USA) and stimulated by substances leached or dissolved from three endodontic sealers (zinc oxide-eugenol based, resinous and calcium hydroxide-based) in a conditioned media was analyzed. The cell viability was achieved by measuring the MTT (Vibrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) reduction after the contact with these substances.

### Experimental groups

Seven groups were established:

Control: treated with fresh medium

MCA 1h: treated with medium conditioned during 1h by the resinous endodontic sealer

MCS 1h: treated with medium conditioned during 1h by the calcium hydroxide based endodontic sealer

MCP 1h: treated with medium conditioned during 1h by the zinc oxide-eugenol based endodontic sealer

MCA 24h: treated with medium conditioned during 24h by the resinous endodontic sealer

MCS 24h: treated with medium conditioned during 24h by the calcium hydroxide based endodontic sealer

MCP 24h: treated with medium conditioned during 24h by the zinc oxide-eugenol based endodontic sealer

### MTT-based cytotoxicity assay

Forty two wells (6 wells/group) of each 96-well microtitration plate containing the activated macrophages (2 x 10<sup>5</sup> cells/well) had the culture medium replaced either by the conditioned medium of each experimental group or by fresh medium for the control group. The conditioned medium was applied to the cells and after a period of 1h was replaced by fresh RPMI 1640. Then, the cell mitochondrial activity analysis was carried out using the MTT-based cytotoxicity assay. The MTT assay involves the conversion of the water soluble MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to an insoluble formazan. The formazan is then solubilized, and the concentration determined by optical density at  $\approx$  570 nm. A MTT reduction analysis kit was used. Immediately after the end of the assay procedures the absorbance was read in a micro plate reader using a 562 nm.

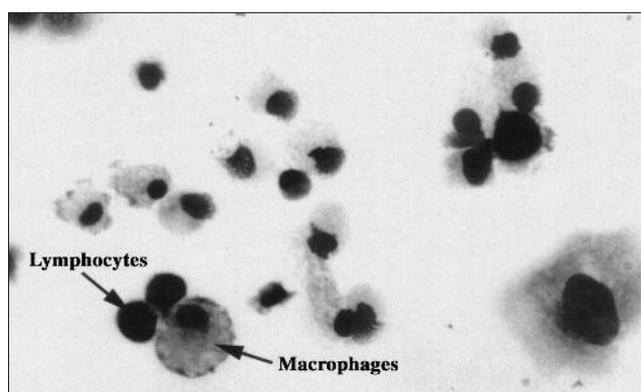
### Statistical analysis

The optical density data, corresponding to the cell viability, obtained from six replicates are present as mean  $\pm$  the standard error of mean. The data were compared by the Kolgomorov-Smirnof's test followed by Friedman's test. The level of significance was 5% (P  $\leq$  0.05).

## Results

### Identification of the peritoneal macrophages

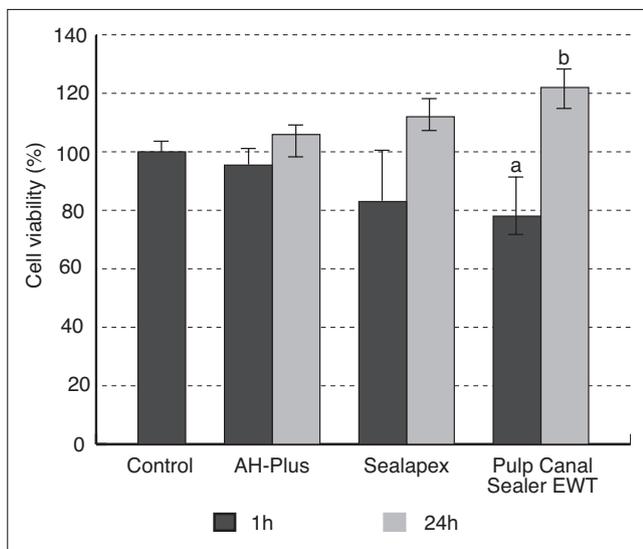
Using the May-Grünwald and Giemsa modified by Rosenfeld stain method was possible to identify the cell population of the inflammatory liquid obtained from the mice peritoneal cavity. Before removal of the non adherent cells most cells presented the morphology of macrophages, but other mononuclear cells were also present (Figure 1).



**Figure 1. Identification of the inflammatory cells of the liquid obtained from the mice peritoneal inflammation (Rosenfeld modified May-Grünwald and Giemsa stain; X400)**

### Cytotoxicity analysis

The data of optical density obtained at the spectrophotometer for the experimental groups were transformed in percentage of the control that was considered as having 100% of viable cells. The Graph 1 represents the mean percentage  $\pm$  the standard error of mean (s.e.m.) of the experimental groups. There were no statistical differences amongst the groups treated with the media conditioned by the different endodontic sealers and the control. The only difference observed was between the groups treated with the zinc oxide-eugenol based endodontic sealer medium conditioned during 1h versus 24h ( $p \leq 0.05$ - Table 1).



**Graph 1. Mean percentages  $\pm$  standard error of mean of the macrophages viability of the different experimental groups. Different letters indicate statistical differences ( $p \leq 0,05$ )**

### Discussion

Endodontic sealers can alter the periapical inflammatory process after the root canal system obturation by either a direct contact with the periapical tissue if extravasations occur, or indirectly when substances leached from the endodontic sealers during their settings reach

this tissue. It is known that the macrophages are the cells from the inflammatory infiltrate responsible for removing dead and dying cells, damaged tissues and particulate materials from the affected tissues<sup>15</sup>. For this reason this study aimed to evaluate the influence of the substances leached from endodontic sealers on the viability of macrophages *in vitro*.

There are several methods for testing biomaterial cytotoxicity. We have chosen to use conditioned media<sup>2</sup> because this method is especially important when direct contact with the materials tested with connective tissue will occur, because this is a humid environment in the clinical practice. Then, in contact with this humid tissue, the setting process could be delayed or prevented, allowing the leaching or dissolution of substances that could influence the periapical tissue healing. Using conditioned media technique, the clinical situation is mimicked and the setting of the endodontic sealers is done in a humid environment, making the study relevant for clinical dentists.

Substances leached from the most common endodontic sealers (e.g. zinc oxide-eugenol based, resinous, and, calcium hydroxide based) were placed in contact with mice peritoneal macrophages *in vitro*. In a previous study, crude conditioned media proved to be highly cytotoxic<sup>2</sup>. Thus, it was decided to work with this medium diluted to 10%, in order to make this comparative study possible. This dilution is appropriate, since in the tissue, the cell number is higher than the number of cells in a culture dish. Moreover, blood and lymphatic vessels are present in the tissue *in vivo*, diluting the substances, differently from what happens in cell culture model.

Two conditioning times were tested: 24h to follow the ISO recommendation and 1h for simulating the clinical condition, because during the first hour after obturation the post-operative pain is more frequent<sup>14</sup>.

The toxicity of the three endodontic sealers was measured *in vitro* using macrophages obtained from mice inflammatory peritoneal liquid. These cells, after morphological characterization, were activated by bacterial products, such as, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and lipopolysaccharide (LPS) from *E.coli*<sup>8</sup>. This activation was done because it is known that activated macrophages respond differently from non activated cells. To mimic the clinical situation it was decided to work with activated macrophages, because in most of the time when an

**Table 1. Statistical analysis**

	Control	MCA 1h	MCA 24h	MCS 1h	MCS 24h	MCP 1h	MCP 24h
Ranks sum	22	18	26	20	33	12	37
Median	101,65	94,03	109,60	94,48	113,90	76,60	121,85
Mean ranks	3,66	3	4,33	3,33	5,5	2	6,16
Mean values	100	94,66	103,93	86,35	110,41	78,21	120,49
Standard deviation	10,56	15,55	15,5	34,19	14,04	26,32	16,32
Friedman (Fr)	16,21						
Degree of Freedom	6						
(p)	0,01						

endodontic treatment is required, bacteria and/or their products from the root canal system have already activated the macrophages of the periapical tissue. Then, the endodontic sealers and/or the substances leached from them will be processed by activated macrophages.

Using the MTT reduction test it was possible to observe that the substances leached from the endodontic sealers tested were non toxic to the activated macrophages, because the cell viability of cultures treated with the conditioned media were similar to that of control cell, independently of the conditioning time.

Corroborating with our study Mendes *et al.*<sup>6</sup> (2003) studying the effect of two zinc oxide-eugenol-based sealers, freshly prepared or after setting for 24h, on mouse-elicited macrophage cultures *in vitro* showed no effect on macrophage viability. Demarco *et al.*<sup>3</sup> (2001) also showed that calcium hydroxide is biocompatible *in vitro*<sup>3</sup>. On the other hand, other studies of cytotoxicity analysis of endodontic sealers *in vitro* presented opposite results showing that resin and zinc oxide-eugenol based endodontic sealers were cytotoxic<sup>10,16</sup>. However, they used other cell types. In fact macrophages seem to be more resistant to foreign material than mesenchymal cells, such as fibroblasts<sup>12</sup> and epithelial cells<sup>16</sup>. Moreover, in these studies the sealers were placed in direct contact with the cells.

When comparing the groups taken into account the medium conditioning time, an interesting observation was done in the groups treated with media conditioned by the zinc oxide-eugenol based endodontic sealer. Although both groups (1h and 24h) presented cell viability similar to that of the control groups, the cell viability of cultures treated with medium conditioned during less time (1h) was significantly smaller than that of

cultures treated with medium conditioned during 24h. This finding could be explained by the presence of eugenol in this sealer, a known toxic substance that probably was more concentrated at the first hours during the sealer setting, but its concentration diminished in 24h after the sealer setting when it was incorporated to the sealer and less available to the medium.

This study has shown *in vitro* that activated macrophages are resistant to the substances leached from the more commonly used endodontic sealers. However, although showing mitochondrial activity, or cell viability, similar to control cells these macrophages cells could have some of their functions disturbed by these substances. In fact, there was already demonstrated that zinc oxide-eugenol sealer has an inhibitory effect on the effector responses measured, such as phagocytosis and nitric oxide production<sup>6</sup>. Thus, new studies must be done in order to understand the effect of endodontic sealers on the periapical tissue.

## Conclusion

Based on the conditions of this study it was concluded that independently of the conditioning time (1h or 24h) the substances leached from the endodontic sealers tested during their settings are non cytotoxic to mice peritoneal macrophages in culture.

## Acknowledgments

We thank the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support. This work was sponsored by FAPESP, Process nº 04/08326-3.

## References

1. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod.* 2003; 29(9):583-6.
2. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9.
3. Demarco FF, Tarquínio SBC, Jaeger MMM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* 2001;32:211-20.
4. International Standard Organization. ISO 7405. Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. Geneva; 1997.
5. Larsen GL, Henson PM. Mediators of inflammation. *Ann Rev Immunol.* 1983; 1;335-59.
6. Mendes STO, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, de Souza Cortes MI, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod.* 2003 Feb;29(2):95-9
7. Metzger Z, Berg D, Dotan M. Fibroblast growth in vitro suppressed by LPS-activated macrophages. Reversal of suppression by cortisone. *J Endod.* 1997;23(8):517-21.
8. Rodríguez D, Keller AC, Fraquim-Mauro EL, Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol.* 2003;171:1001-8.

9. Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. Mem Inst Butantan. 1947;20:315-28.
10. Schwarze T, Fielder I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. J Endod 2002;28(11):784-6.
11. Sousa LR, Aun CE. Obtenção de macrófagos ativados para trabalhos científicos. Rev Odontol UNICID. 2003;15(3):165-72.
12. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Efeito de substâncias liberadas por cimentos endodônticos distintos na atividade mitocondrial de fibroblastos de polpa. Braz Oral Res. 2005;19(Suppl):164.
13. Sousa LR, Lauretti LGB, Guimarães JLH, Abrão CV, Bombana AC. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos: Sealer 26, AH-Plus e do novo sistema resinoso de obturação – Epiphany. RPG Rev Pós-Grad. 2004;11(3):285.
14. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. Endod Dent Traumatol. 1990;6:89-96.
15. Trowbridge HO, Emling RC. Inflammation- a review of the process. 5th ed. Carol Stream: Quintessence; 1997.
16. Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. J Endod. 2000;26(12):703-7.

Received in 14/01/2006

Accepted in 20/3/2006

