



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

FLÁVIA MEDEIROS SAAVEDRA DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SUBSTÂNCIA P, RECEPTORES
NK1 E CITOTOXICIDADE EM CULTURA DE FIBROBLASTOS
APÓS O CONTATO COM CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

PIRACICABA

2017

FLÁVIA MEDEIROS SAAVEDRA DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SUBSTÂNCIA P, RECEPTORES
NK1 E CITOTOXICIDADE EM CULTURA DE FIBROBLASTOS
APÓS O CONTATO COM CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA FLÁVIA MEDEIROS SAAVEDRA DE PAULA E ORIENTADA PELO PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

PIRACICABA

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132882/2015-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

Sa12a Saavedra, Flávia Medeiros, 1990-
Avaliação da expressão de substância P, receptores Nk1 e citotoxicidade em cultura de fibroblastos após o contato com cimentos endodônticos / Flávia Medeiros Saavedra de Paula. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Alexandre Augusto Zaia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ligamento periodontal. 2. Substância P. 3. Receptores da neurocinina-1.
I. Zaia, Alexandre Augusto, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers on fibroblast cell culture and expression of substance P and Nk-1 receptors

Palavras-chave em inglês:

Periodontal ligament

Substance P

Receptors, neurokinin-1

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Alexandre Augusto Zaia [Orientador]

Luciana Moura Sassone

Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Data de defesa: 20-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata FLÁVIA MEDEIROS SAAVEDRA DE PAULA aprovada.

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

PROF^ª. DR^ª. LUCIANA MOURA SASSONE

PROF. DR. EMMANUEL JOÃO NOGUEIRA LEAL DA SILVA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Maria Emília Augusta Saavedra Baptista de Paula, por todo o cuidado, carinho e tempo investidos em mim durante esses vinte seis anos de vida. Obrigada pelo suporte e compreensão ao longo desses últimos dois anos. Você é a minha inspiração constante na busca em ser uma pessoa melhor a cada dia. Essa conquista e todas que virão serão sempre dedicadas á você, minha vizinha. Te amo.

Ao meu grande amor, marido e melhor amigo, Leonardo Vieira Peroni. Obrigada pela paciência dos últimos dois anos. Ninguém jamais vai compreender melhor a quão árdua foi essa jornada quanto você. Pós-graduação não é fácil, casar durante a pós-graduação é mais difícil ainda e mesmo assim você embarcou nessa loucura comigo. Obrigada por aceitar os meus defeitos, a minha ausência, minhas fraquezas, pelo amor incondicional e pela motivação constante. Este trabalho não teria sido possível sem cada segundo no qual você me apoiou e incentivou. Você foi o meu melhor acerto. Te amo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e do diretor associado Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, por ser fonte infinita de conhecimento endodôntico e estar sempre disposto à compartilhá-lo. Obrigada por toda a sua atenção e paciência comigo, pelos ensinamentos transmitidos e por sua confiança em mim para a execução deste trabalho. A sua orientação me faz crescer como profissional e me ajuda a ser uma pessoa melhor e por isso serei sempre grata.

Aos professores da Área de Endodontia da FOP/UNICAMP, Prof. Dra. Adriana de Jesus Soares, Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz e Prof. Dr. José Flavio Affonso de Almeida, muito obrigada por toda a atenção e tempo dedicados à todos nós da pós-graduação durante os seminários, pelos conhecimentos transmitidos e pela agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, obrigada por toda a paciência que teve comigo, por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas e compartilhar o seu conhecimento. Sua amizade e orientação foram essenciais nesta jornada. Além disso, agradeço também por ter aberto as portas da UNIGRANRIO para a execução dos experimentos desta dissertação, tornando possível a execução deste trabalho.

À Prof. Dra. Claudia Maria Pereira, professora da UNIGRANRIO, por todo o tempo e extrema atenção dedicadas a mim e ao meu trabalho nos últimos meses. Sua forma de trabalho e integridade de caráter serão sempre fonte de inspiração para mim.

À Ana Beatriz Machado Lima, analista de laboratório da UNIGRANRIO, pelo auxílio durante a execução trabalho.

À Prof. Dra. Luciana Moura Sassone, professora da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Serei sempre grata por ter me transmitido

seu amor pela endodontia e pela ciência. Você sempre será um dos meus maiores exemplos como professora e orientadora. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela amizade construída ao longo desses anos, pelos conselhos, por toda a paciência quando ainda era uma aluna de graduação e por ter me inspirado a ser mais e melhor.

À professora Tereza Berlink, ao Prof. Paulo Egreja e ao Prof. Fernando Marques Cunha, pela amizade e ensinamentos compartilhados, serei sempre grata pela contribuição que vocês tiveram na minha formação dentro da endodontia.

Aos meus queridos amigos Augusto Rodrigues Lima, Diogo Henrique Silva, Jaqueline Mafrá Lazzari e Priscila Amanda Francisco, por toda a amizade construída nos últimos dois anos. Foi muito bom compartilhar com vocês cada alegria e dividir o peso das frustrações. Todos os problemas pareciam menores com vocês por perto e cada um de vocês foi essencial para que eu pudesse completar esta jornada com êxito. Guto, obrigada por ser um ouvido amigo, pelos conselhos e pela paciência; Gazé, minha dupla de grande relevância, obrigada pelas conversas e pelas risadas, você foi uma inspiração de que mesmo contra todas as adversidades, com esforço, podemos concluir os nossos objetivos; Pri, obrigada pela amizade sincera, por estar sempre disposta e sempre arranjar algum tempinho para me ajudar. Jaque, temos tanto em comum que nossa afeição foi instantânea, obrigada por ser meu ombro amigo constante e incansável.

Às amigas Bruna Ueno, Bruna Milaré, Eloá Pereira e Rafaela Chapola, agradeço pela amizade e pelo convívio diário tão agradável.

À amiga Aline Cristine Gomes, por todo o companheirismo dos últimos três anos. Obrigada pela amizade sincera, por todos os ensinamentos transmitidos, por compartilhar comigo cada momento, pessoal e profissional. Você foi muito importante na confecção deste trabalho, direta e indiretamente, obrigada por tudo.

Aos amigos Ana Carolina Corrêa, Ana Carolina Pimentel, Andrea Cardoso Pereira, Aniele Lacerda, Daniel Herrera, Felipe Anacleto, Marlos Ribeiro, por todos os momentos divididos nos últimos anos, pelos ensinamentos compartilhados e amizade

construída. O convívio com cada um de vocês me fez uma pessoa melhor. Obrigada por todo o carinho e amizade.

Aos funcionários do laboratório de Endodontia da FOP/UNICAMP Ana Godoy e Maicon Passini, pelo convívio agradável, amizade criada e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus queridos amigos da Radiologia FOP/UNICAMP, Liana Ferreira, Mayra Yamasaki, Yuri Nejaim, Amanda Farias, Gustavo Santaella, obrigada pela amizade incrível, momentos de descontração e por toda atenção e carinho comigo.

Á minhas amigas do Rio de Janeiro, Aline Dauch, Livia Taboadela, Luanna Corrêa, Marcelle Loureiro, Nicole Bentes e Rafaela Tuler, por serem a família que eu escolhi ter. Obrigada pelo apoio e amizade.

Á minha irmã, Aline Medeiros Saavedra de Paula, pela amizade intensa, por compartilhar comigo cada momento da vida, por compreender a minha ausência e as minhas limitações. Tenho muito orgulho de você. Te amo.

Áos meus pais, pelo amor, mesmo que muitas vezes incompreendido. Vocês sempre fizeram o melhor que puderam e sou grata por tudo.

Aos meus sogros, José Peroni e Dileuza Vieira Peroni, por todo o apoio nos últimos anos e todo o carinho que sempre tiveram por mim.

Ao meu tio Lúcio Saavedra, por ter me emprestado o carro para ir à Duque de Caxias, durante mais de um ano. Sei que você muitas vezes se privou do conforto para fornecê-lo a mim e isso é uma prova de amor. Obrigada!

Ao meu filhote, Carlos Bacon, o melhor cachorro do mundo, meu cãopanheiro fiel. Obrigada por todo amor.

**“A quem muito foi dado, muito
será exigido; e a quem muito foi
confiado, muito mais será pedido”
(Lucas 12:48)**

RESUMO

Os cimentos endodônticos são agentes de união entre a guta percha e as paredes do canal radicular. Embora fiquem na maioria dos casos contidos no interior do canal, por vezes podem ser extruídos até o ligamento periodontal e pouco se sabe sobre o potencial destes materiais de causar alguma sensação dolorosa nestas condições. Dentre os mediadores químicos inflamatórios, a substância P se destaca por estar relacionada à fisiologia da dor. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos e se eles são capazes de elevar a produção da substância P e de seus receptores NK1 em uma cultura de fibroblastos da linhagem MRC-5. Assim, a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos (AH Plus, Endométhasone N, Endoseal e MTA Fillapex) foi verificada pelo ensaio de citotoxicidade 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) para a aquisição da porcentagem de viabilidade celular em cada uma das diluições. As células foram então expostas aos extratos dos materiais testados em duas diluições escolhidas (1:4 e 1:8) e, após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para a realização do ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa) para substância P. Já as células tiveram o seu RNA extraído para a realização de PCR em tempo real, que quantificou a expressão dos genes TAC1 e TACR1 referente à substância P e receptor NK1, respectivamente. Observou-se que o cimento MTA Fillapex foi o mais citotóxico dentre os materiais testados e este cimento endodôntico foi o único material capaz de induzir a produção de substância P após o contato de seu extrato com a cultura celular. Além disso, todas as amostras expostas aos extratos dos cimentos endodônticos apresentaram expressão dos genes TAC1 e TACR1 aumentada, quando comparados ao grupo controle negativo. Portanto, de acordo com os resultados do presente estudo, conclui-se que todos os cimentos endodônticos são citotóxicos e que a expressão de substância P foi influenciada pelo contato da cultura de células com a elução do cimento endodôntico MTA Fillapex. Contudo, houve um aumento da expressão dos genes codificantes da substância P e do seu receptor NK1 em todas as amostras.

Palavras-chave: Ligamento Periodontal. Substância P. Receptores da Neurocinina-1.

ABSTRACT

Root canal sealers are bond agents between gutta percha and the root canal walls. Although they are in most cases contained within the canal, they are able to be extruded into the periodontal ligament sometimes, and there isn't many knowledge about the potential of these materials to cause any painful sensation under these conditions. Among the chemical mediators of inflammation, substance P stands out because it is directly related to the physiology of pain. Thus, the aim of the present study was to analyze the potential of substance P and NK1 receptors production by different endodontic root canal sealers, and their cytotoxicity, when in contact with MRC5 fibroblasts cell culture. So, the cytotoxicity of four endodontic root canal sealers (AH Plus, Endométhasone N, Endoseal and MTA Fillapex) were verified by the cell viability test 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to gain the percentage of viable cells in each of the dilutions. The cells were then exposed to the extracts of the materials in two chosen dilutions (1:4 and 1:8). After 24 hours the supernatants were collected for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for substance P, and the cell cultures had their RNA extracted for real-time PCR, which quantified the expression of TAC1 and TACR1 genes which encodes substance P and NK1 receptors, respectively. The results showed that MTA Fillapex was the most cytotoxic materials tested. In addition, it was the only material able to induce the production of substance P by fibroblasts. All samples showed increased TAC1 and TACR1 gene expression when compared to the negative control group. Therefore, we can conclude that all endodontic root canal sealer materials are cytotoxic, but the expression of substance P was induced only by MTA Fillapex. However, there was an increased expression of the genes TAC1 and TACR1 influenced by all root canal sealers.

Keywords: Periodontal Ligament. Substance P. Receptors, Neurokinin-1.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	68
Anexo 1- Tabela com a composição dos cimentos endodônticos	68
Anexo 2- Protocolo ELISA	69

1 INTRODUÇÃO

O propósito do tratamento endodôntico é a remoção do tecido pulpar, a eliminação da infecção, quando presente, e o adequado selamento do sistema de canais radiculares. A obturação é a etapa do tratamento endodôntico que objetiva o total preenchimento do sistema de canais radiculares recém descontaminados, a fim de impedir a microinfiltração bacteriana oriunda do meio oral, dos tecidos apicais e periapicais para o interior dos mesmos (Ray e Trope, 1995; Barthel et al., 2001; Lopes e Siqueira, 2015). Esse preenchimento é considerado uma das chaves do sucesso da terapia endodôntica (Schilder, 1967; Saunders e Saunders, 1994).

A maioria dos tratamentos endodônticos utiliza a guta percha em combinação com algum cimento endodôntico para o adequado selamento dos canais radiculares. Uma importante função do cimento é preencher os espaços existentes entre a guta-percha e as paredes do canal radicular. Atualmente, cimentos endodônticos estão disponíveis em diversas fórmulas tais como cimentos a base de óxido de zinco e eugenol; cimentos ionoméricos; cimentos contendo hidróxido de cálcio e cimentos resinosos, dentre outros (Silva et al., 2012a).

Embora os cimentos endodônticos sejam, inicialmente, idealizados para ficarem contidos no interior do sistema de canais radiculares, sua extrusão para o ligamento periodontal pelo forame apical e canais laterais pode ser observada (Holland et al., 2005; Yamaguchi et al., 2007). Já foi demonstrado que a solubilização de alguns tipos de materiais obturadores gera subprodutos que também podem permanecer em contato íntimo com os tecidos periapicais por um período prolongado, podendo gerar danos aos tecidos circundantes (Bernath e Szabo, 2003; Ricucci et al., 2016; Silva et al., 2016c). Além disso, mesmo quando confinado no interior do sistema de canais radiculares, o cimento endodôntico pode desenvolver uma resposta inflamatória de intensidade variável nos tecidos periapicais (Ricucci e Siqueira, 2013). Sendo assim, os cimentos endodônticos devem ter as suas propriedades biológicas constantemente testadas, de forma abrangente e independente. Estas características devem ser primeiro rastreadas por testes *in vitro* previamente a utilização clínica de

tais materiais, a fim de minimizar a incidência de efeitos adversos locais e/ou sistêmicos. (Schwarze et al., 2002ab; Silva et al, 2012a; Silva et al, 2016a).

Diversos estudos encontrados na literatura endodôntica indicam o potencial citotóxico dos mais variados tipos de cimentos obturadores (Torabinejad et al., 1995; Leonardo, 2000; Silva et al., 2012b; Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b; Trichês et al., 2013; Silva et al., 2015; Assmann et al., 2015; Silva et al., 2016b). Entretanto, apesar da citotoxicidade bastante estudada, a literatura ainda é escassa no que diz respeito aos efeitos tóxicos desses cimentos e prejuízo potencial no tratamento endodôntico seja em seu prognóstico ou relativo ao bem-estar do paciente. Uma dessas lacunas é relacionada à possível sensação dolorosa causada pela resposta inflamatória oriunda do contato dos cimentos endodônticos com os tecidos periapicais.

Os efeitos citotóxicos podem estar relacionados a uma agressão tecidual provocada pelo contato direto entre cimentos endodônticos e a região periapical, em consequência da liberação de mediadores químicos (Silva et al., 2012a; Diomete et al., 2014), que tem importante papel na modulação de reações inflamatórias.

Dentre os mediadores químicos inflamatórios, a substância P, um peptídeo pertencente à família da taquicinina, assume importante papel (Olgard et al., 1997). A substância P é um neuropeptídeo produzido por corpos celulares e neurônios periféricos presentes no gânglio trigêmeo, estando presente em grande quantidade nas fibras responsáveis pela inervação de tecido dentinário e pulpar (Maggi, 1995; Caviedes-Bucheli et al, 2008a). O ligamento periodontal também possui células capazes de produzir tal substância (Caviedes-Bucheli et al., 2011).

A concentração de substância P tende a aumentar em processos inflamatórios (Caviedes-Bucheli et al., 2008a), pois afeta diretamente a atividade de células do sistema imune, podendo induzir a ação de mediadores inflamatórios. Este neuropeptídeo vem sendo encontrado em maior quantidade nos casos de pulpite irreversível (Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2007) e inflamação periapical (Caviedes-Bucheli et al., 2010b). Estudos relatam também aumento da expressão da substância P em casos de trauma oclusal (Caviedes-Bucheli et al., 2011) e durante o tratamento endodôntico, em pacientes com periodontite apical, situação clínica onde

observou-se uma elevação nos níveis de substância P no fluído crevicular gengival (Shin et al., 2011).

Já que relata-se na literatura o papel pró-inflamatório da substância P e tendo-se em vista que pesquisas anteriores demonstram que a dor de origem pulpar e periapical está associada a presença deste neuropeptídeo no tecido inflamado, então é razoável sugerir a hipótese de que esta substância exerça um papel chave na fisiopatologia da inflamação provocada pelo contato de um material citotóxico, como o cimento endodôntico, com o tecido periapical.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Substância P – Formação e origem

A substância P é um peptídeo da família das taquicininas (hormônios encontrados em vertebrados e invertebrados), proveniente do gene TAC1 que foi identificada no início do século XX. Esses neuropeptídios são evolutivamente os neurotransmissores mais antigos, talvez até mais velho do que acetilcolina e catecolaminas. A primeira referência vem do ano de 1931, quando substância P foi isolada como um produto extraído de um equinodermo, a partir de seu cérebro e intestino (Von Euler e Gaddum, 1931). A substância P foi extensivamente estudada durante o século XX. Por muitos anos, acreditou ser a única taquicinina de mamíferos considerada como um neuropeptídeo. Esta informação foi revertida com descoberta de Neuroquinina A (NKA) e Neuroquinina B (NKB) (Kangawa et al., 1983).

O gene pré-protaquicinina-I expressa quatro diferentes formas de mRNA, sendo que duas delas (β e γ) codificam a síntese de substância P e de neuroquinina A, enquanto as formas δ e α codificam somente a substância P (Muñoz et al., 2010). A síntese de substância P ocorre nos ribossomos de células neurais, sendo depois armazenada em vesículas nas quais é transportada para as terminações nervosas centrais e periféricas e, só neste processo, destaca-se a endopeptidase neutra e enzima conversora da angiotensina. A endopeptidase neutra está envolvida no metabolismo da substância P no cérebro e em tecidos periféricos. A enzima conversora da angiotensina degrada a substância P no plasma, fluido cérebro-espinhal e substância negra, degradando fragmentos da substância P liberados pela endopeptidase neutra.

Outras células, além dos neurônios, também podem produzir substância P. Células inflamatórias tais como macrófagos, linfócitos, células dendríticas e fibroblastos estão entre as células que também liberam esta substância, além das terminações nervosas (Killough et al., 2009; El Karim et al., 2009).

A substância P vem sendo descrita como um neurotransmissor associado a dor e esta substância desempenha um papel importante na transmissão de estímulos nocivos na medula espinhal (Seybold, 2009).

É amplamente aceito que diversos fatores podem ativar e/ou sensibilizar os nociceptores em locais de injúria tecidual e induzir a liberação de neuropeptídios na periferia deste tecido (Cheng e Ji, 2008; Seybold, 2009). O aumento da produção de substância P pode estar relacionado à abertura de canais iônicos de receptores transientes vanilóides do tipo I, localizados nas fibras sensoriais, quando sensibilizados por calor, ou pela molécula capsaicina, por exemplo. Quando a bradicinina, que é uma molécula vasodilatadora, se liga ao seu receptor B2 em neurônios sensoriais resulta na estimulação da fosfolipase C e assim de uma cascata de eventos celulares que resultam na ativação da proteína quinase C a qual já foi demonstrada ser capaz de estimular a secreção de substância P por terminações nervosas sensoriais. Outros compostos não excitam diretamente os neurônios sensoriais, mas diminuem o seu limiar de sensibilidade. As prostaglandinas, produzidas em tecido inflamado, se ligam a seus receptores nas fibras sensoriais e diminuem o limiar de sensibilidade dos neurônios. Como consequência ela também aumenta a liberação de substância P em resposta à estímulos biológicos, químicos e físicos (Richardson e Vasko, 2002).

2.2 Substância P – Mecanismos de Ação

A interação da substância P com seus receptores induz diretamente a vasodilatação o que aumenta a permeabilidade vascular e permite o extravasamento de plasma e a degranulação de mastócitos. Esta degranulação de mastócitos libera histamina que por sua vez amplifica ainda mais os processos vasculares e ativa nociceptores (Moriarty et al., 2000). Os linfócitos, granulócitos e macrófagos possuem receptores para substância P e essas células podem ser estimuladas a produzir citocinas. Os macrófagos estimulados pela substância P produzem os mediadores inflamatórios prostaglandina E2 e tromboxano, assim como as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral. Todos estes eventos moleculares sustentam a síntese e a liberação de novas moléculas de substância P, perpetuando assim este ciclo vicioso. Além disso, estes mecanismos não envolvem apenas as fibras no local do dano tecidual, mas também se estendem para tecidos circundantes que não foram danificados, onde provocam uma hiperalgesia secundária. Tendo em vista o exposto, a substância P pode ser considerada como um importante mediador na inflamação de origem neurogênica e

associado à hiperalgesia (Sacerdote e Levrini, 2012). Por isso, esta substância representa um importante alvo em pesquisas destinadas a esclarecer o processo relacionado à fisiopatologia da dor e na busca por formas de seu controle, tentando minimizar as consequências deletérias deste neuropeptídeo nos tecidos injuriados.

2.3 Receptores da substância P

Para desencadear seus efeitos celulares a substância P deve ligar-se à receptores específicos expressos na superfície externa das células alvo (Caviedes-Bucheli et al., 2007). Os efeitos biológicos da substância P são, então, induzidos a medida que este neurotransmissor se liga à receptores neuroquinina (NK) e as ações biológicas da substância P e de outras taquicininas no tecido alvo são mediadas por estes receptores NK, que pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (Harrison S e Geppetti, 2001). Existem três tipos conhecidos de receptores do tipo NK: O NK1, NK2 e NK3. Eles exibem diferentes preferências para taquicininas. A substância P se liga preferencialmente aos receptores NK1, e esta interação é capaz de gerar alterações inflamatórias e de atuar sobre a transmissão da dor (Muñoz e Coveñas, 2013a). Muitos estudos revelaram uma vasta distribuição de receptores NK1 não só no sistema nervoso central dos mamíferos, mas também nos tecidos periféricos, como nas células endoteliais vasculares, células musculares, gastrointestinais e genito-urinárias, em células do pulmão, da glândula tireóide, e do sistema imunológico (Wolf et al 1985; Saffroy et al., 1988; Maeno et al 1993; Nakaya et al 1994; Ebner e Singewald 2006; Ebner et al 2009; Muñoz e Covenas 2011). Esses receptores podem ser encontrados também em fibroblastos, em células do ligamento periodontal e em células da polpa (Fristad et al., 2003; Park et al.,2004; Kido et al., 2005; Caviedes-Bucheli et al.,2006).

No ano de 2006, Caviedes-Bucheli et al. utilizaram-se do ensaio radioligante com o objetivo de comprovar a presença de receptores do tipo NK1 no tecido pulpar humano. Foram comparadas amostras do tecido pulpar de pré-molares hígidos (indicados para extração por motivo ortodôntico), de dentes que foram submetidos a inflamação pulpar por meio de um acesso cavitário até a câmara e dentes que foram diagnosticados com pulpíte irreversível aguda. Todas as amostras apresentaram a presença de receptores do tipo NK1, contudo a maior concentração

destes receptores foi encontrada nas polpas dos dentes diagnosticados com pulpite irreversível aguda, seguido pelas amostras da polpa de dentes induzidos à inflamação e por fim, das polpas de dentes hígidos. Tendo-se concluído que a expressão de receptores para substância P nos tecidos pulpare é significativamente aumentada durante fenômenos inflamatórios como a pulpite irreversível aguda.

Já os receptores NK2 e NK3 possuem afinidade mais elevada pelos neurotransmissores NKA e NKB, respectivamente (Snijdelaar et al., 2000; Harrison e Geppetti, 2001). Apesar de tais preferências, estas taquicininas podem atuar em todos os três tipos de receptores sob certas condições tais como a disponibilidade do receptor ou a concentração destas substâncias no meio (Sacerdote e Levrini, 2012).

2.4 Substância P – Funções

Após se ligar aos receptores NK1 a substância P regula diversas funções biológicas, fisiológicas e patofisiológicas.

A Substância P tem sido associada a regulações fisiológicas no sistema cardiovascular, na dilatação do sistema arterial, na sobrevivência neuronal e degeneração destas células, na percepção sensorial, na regulação dos mecanismos respiratórios, no controle de movimentos, na micção e motilidade gástrica e na salivação. Além disso ainda apresenta funções em processos fisiopatológicos do câncer, na depressão, em doenças degenerativas do sistema nervoso central, em inflamações e na regulação da dor (Unger et al. 1981; Quartara e Maggi 1998; Samsam et al. 2000; Bang et al. 2003; Ebner and Singewald 2006; Ebner et al. 2009; Muñoz and Coveñas 2013a).

A Substância P também atua como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso (Harrison e Geppetti, 2001). Sabe-se, ainda, que as taquicininas são capazes de modificar a resposta de diferentes células inflamatórias, incluindo os mastócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e macrófagos (Walsh et al., 1995), apresentando também efeito potencializador da proliferação e diferenciação dos linfócitos, da secreção de citocinas e da produção de imunoglobulinas, sendo, portanto, um potente imunomodulador (Hokfelt, Pernow e Wahren, 2001; Harrison e Geppetti, 2001).

Além disso, substância P é um importante regulador da motilidade celular e indutor de quimiotaxia em células como leucócitos e monócitos. Ela também estimula a migração de células *natural killers* de maneira dose-dependente (Ruff et al., 1985; Schratzberger et al., 1997; Dunzendorfer et al 1998; Feistritzer et al., 2003). As plaquetas também expressam a substância P quando ativadas, além disso, estas células também expressam receptores NK1, cujo bloqueio por meio de anticorpos causa inibição da agregação plaquetária (Graham et al., 2004).

2.5 Substância P no tecido pulpar

A Substância P apresenta um importante papel no processo inflamatório pulpar. Já foi demonstrado que esta substância é liberada no tecido pulpar quando estímulos químicos, mecânicos ou térmicos são aplicados ao dente (Caviedes-Bucheli et al., 2005, 2008, 2010b, 2011; Javed et al., 2015).

Há três tipos de fibras nervosas presentes no tecido pulpar, as fibras do tipo A-beta (sensoriais), A-delta e as do tipo C (responsáveis pela percepção da dor). As fibras do tipo C estão fortemente vinculada a microinervação da polpa (Awawdeh et al., 2002). Quando estimuladas, as porções terminais das fibras C liberam neuropeptídeos, tais como o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), a NKA e a substância P (Olgart e Kerezoudis, 1994).

As fibras que se localizam no centro da polpa não só liberam, mas também são reativas à substância P. Estas fibras estão associadas a grandes vasos sanguíneos, enquanto na periferia, elas estão associadas a vasos menores. Por outro lado, as fibras não relacionadas com os vasos sanguíneos passam pela camada subodontoblástica e espalham-se na pré-dentina e, algumas delas, cruzam esta camada, chegando na dentina (Rodd e Boissonade 2003), sendo assim, injúrias que acometem a dentina coronária por vezes, podem promover repercussões nestas fibras nervosas, como a liberação de substância P não só na dentina como também na polpa.

A substância P é sintetizada no corpo neural de fibras C, ela atinge as porções terminais das fibras através de transporte axonal onde é armazenada e/ou libertada por exocitose, para suas funções através da sua ligação aos receptores NK situados, como já foi citado, na maioria das células inflamatórias. Este neuropeptídeo

induz a liberação de mediadores inflamatórios, tais como a histamina, citocinas, prostaglandinas e o tromboxanos, aumentando assim a permeabilidade vascular e ampliando o processo inflamatório (Pernow,1983; Payan,1989; Chancellor-Freeland et al., 1995; Sacerdote e Levrini, 2012).

Outra importante célula na fisiologia pulpar é o fibroblasto. Elas são a maior população celular encontrada na polpa e são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular, mantendo íntegra a estrutura deste tecido. Os fibroblastos também participam de forma central na patogênese da inflamação pulpar, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, em resposta à estimulação bacteriana ou por intermédio da substância P (Yang et al., 2003; Patel et al., 2003; Coil, Tam e Waterfield, 2004; Park, Hsiao e Huang, 2004; Yamaguchi et al., 2008).

O processo inflamatório leva a um aumento na pressão intra-pulpar, tendo um efeito direto sobre este tecido, agravado pelo impedimento da expansão da polpa dentária devido ao ambiente no qual está confinada. Isso leva a uma redução no fluxo de sangue podendo comprometer a vitalidade pulpar (Kim,1990). Contudo, outros estudos indicam que a polpa possui um mecanismo de feedback fisiológico que atua de modo contrário ao aumento de pressão no local. Estão entre estes mecanismos o aumento do fluxo linfático e de absorção do fluido intersticial para capilares em áreas não inflamadas, razão pela qual a inflamação da polpa pode perdurar por um longo período de tempo restrita a uma área limitada do tecido, sendo que a cura do tecido pulpar é possível se medidas adequadas para a remoção do agente irritante forem tomadas (Heyeraas e Berggreen, 1999).

Apesar de sua ação na exacerbação de processos inflamatórios e na transdução da dor, tem sido sugerido que a substância P também desempenha um papel significativo na regulação homeostática do tecido pulpar, mantendo o tônus vascular, assegurando o fluxo sanguíneo suave e o fornecimento consistente de nutrientes para o tecido, atuando também na regulação da pressão pulpar intersticial e estimulando o crescimento de células pulpares, tais como fibroblastos e células similares a odontoblastos (Trantor et al., 1995, Patel et ai. 2003, Park et al., 2004).

Já no ano de 1977, Olgart et al., relataram a presença de substância P na polpa dental. Em seu trabalho, os autores revelaram a presença deste neuropeptídeo em polpas dentais de gatos que foram submetidos a acessos cavitários até a câmara pulpar, onde houve a coleta do tecido. Também foram coletados dentes hígidos dos mesmos animais, nos quais a presença de substância P não foi detectada ou apresentou baixa concentração quando comparada as amostras dos dentes acessados (Olgart et al., 1977).

Bowles et al., em 2003, avaliaram a hipótese da pulpíte irreversível estar associada com o aumento da atividade de neurônios sensoriais, medida através da expressão de substância P imunoreativa. A presença de substância P extracelular em dentes hígidos indicados para extração foi comparada com a encontrada em dentes com pulpíte irreversível, necessitando de tratamento endodôntico. Os níveis extracelulares de substância P foram significativamente maiores nos dentes diagnosticados com pulpíte irreversível. Este achado permitiu que os autores concluíssem que a presença de mediadores químicos da inflamação apresenta significativa mudança quando comparadas polpas saudáveis e inflamadas irreversivelmente e que isso pode contribuir para o aparecimento de sinais e sintomas clínicos (Bowles et al., 2003).

Em 2005, Caviedes-Bucheli et al., avaliaram a expressão de substância P na polpa dental após preparos cavitários por meio de radioimunoensaio. A expressão de substância P foi comparada entre polpas de pré-molares hígidos e de dentes que sofreram preparos cavitários extensos. Após a extração destes dentes a presença de substância P no tecido pulpar foi verificada. Os autores concluíram que todos os dentes apresentaram produção de substância P e que este neuropeptídeo é liberado em maior quantidade durante os procedimentos odontológicos comuns (como preparo de cavidades) e sua expressão pode ter um significado clínico importante em termos de inflamação e de dor (Caviedes-Bucheli et al., 2005).

Tendo em vista o importante papel que os neuropeptídios exercem durante a inflamação do tecido pulpar, no ano de 2006, Caviedes-Bucheli et al., avaliaram a expressão de Substância P, do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), da NKA, do neuropeptídeo Y (NPY) e do Peptídeo vasoativo intestinal (PVI) presentes

na polpa dentária saudável e inflamada, através de radioimunoensaio. Amostras de polpas de dentes com pulpite irreversível, polpas de dentes saudáveis submetidos a preparos cavitários extensos e polpas de dentes saudáveis indicados para extração foram comparadas. Os autores concluíram que a expressão de PRGC, Substância P, NKA que são liberadas pelas fibras C e NPY (liberado a partir de fibras simpáticas) é significativamente maior em polpas inflamadas do que em polpas normais. Além disso, a expressão do PIV liberado por fibras parassimpáticas não se mostrou elevada em polpas inflamadas (Caviedes-Bucheli et al., 2006).

No ano de 2008, Caviedes-Bucheli et al., verificaram se diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em géis clareadores dentais seria capaz de alterar a expressão de substância P no tecido pulpar. Os níveis de substância P foram medidos através de radioimunoensaio. Pôde-se concluir que todos os sistemas de clareamento dental aumentaram significativamente a expressão em substância P na polpa dental humana, quando comparadas ao controle negativo (Caviedes-Bucheli et al., 2008).

Com o objetivo de comparar a concentração de substância P e de PRGC em polpas de dentes com pulpite irreversível assintomática e de dentes com pulpite irreversível sintomática, Sattari et al., 2010, utilizaram ensaio imuno-enzimático e polpas de dentes hígidos como controle. Estes autores detectaram a presença de substância P em todos os grupos, porém, existe uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração de substância P em dentes com pulpite irreversível, em relação ao controle. Contudo, não houve diferença entre os níveis de substância P nos grupos com e sem sintomatologia (Sattari et al., 2010).

Ainda no ano de 2010, Caviedes-Bucheli et al., verificaram a expressão de substância P na polpa dental após o processo de hibridização em dentes com preparo cavitários classe V. Estes adesivos aumentaram a liberação de substância P, sendo que os adesivos do tipo auto-condicionantes apresentaram maior liberação de substância P em comparação com os adesivos de 2 passos (Caviedes-Bucheli et al., 2010b).

No ano de 2011, estes autores verificaram a expressão de substância P diante de um trauma oclusal causado propositadamente em dentes saudáveis

indicados para extração por motivos ortodônticos. Concluiu-se que tal interferência aumentou a expressão de substância P tanto na polpa dentária humana como no ligamento periodontal, quando comparada ao grupo controle de dentes hígidos (Caviedes-Bucheli et al.,2011).

Em 2013, foi comparada a expressão de substância P em polpas de dentes submetidos a uma restauração classe V com cimentos de ionômero de vidro, com cimentos adesivos, polpas de dentes submetidos somente ao preparo cavitário e controles negativos. Uma maior quantidade deste neuropeptídeo foi encontrada no grupo submetido a restauração com cimentos adesivos, seguido pelo grupo do cimento de ionômero de vidro, e por fim, o grupo que foi submetido somente ao preparo cavitário. Todos estes grupos apresentaram expressão de substância P significativamente superior ao grupo controle (Caviedes-Bucheli et al.,2013b).

No ano de 2015, Javed et al. fizeram uma revisão sistemática sobre a influência das forças ortodônticas na polpa dental, mostrando que diversos artigos relacionam a influência de forças ortodônticas e as respostas celulares da polpa dentária humana, que através da liberação de neurotransmissores e células inflamatórias podem ocasionar calcificações, alterações vasculares e fibroses. (Javed et al.,2015).

Por outro lado, a substância P também desempenha um papel importante na reparação de polpa após uma lesão. A reparação de tecidos induzida pela substância P decorre das propriedades quimiotáticas deste neuropeptídeo, que favorece o recrutamento de várias linhagens celulares mielóides, linfóides, células dentríticas, macrófagos, células progenitoras epiteliais e células tronco da polpa dentária. A substância P também promove a diferenciação e proliferação de células endoteliais, essenciais ao processo de reparação tecidual (El Karim et al., 2009; Kohara et al., 2010).

Além disso, a substância P também regula a angiogênese no tecido pulpar, quando relacionada a capacidade deste tecido de se proteger da ação mecânica de traumas oclusais ou simplesmente da mastigação. Neste processo estão envolvidas ações diretas (modulação do crescimento de células endoteliais) e indiretas (atraindo células com potenciais angiogênicos para o local da lesão) da substância P. O tecido

da polpa dentária humana responde ao trauma oclusal e a função mastigatória por meio de um fenômeno inflamatório neurogênico no qual a substância P desempenha um papel importante por meio de seus mecanismos diretos e indiretos de angiogênese através da sua ação quando ligada a seus receptores NK1 em diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais e em células inflamatórias, levando a formação de novos vasos sanguíneos, essenciais para a formação de tecido mineralizado como um mecanismo de defesa do tecido pulpar (Caviedes-Bucheli et al., 2016).

2.6 Produção de substância P pelo ligamento periodontal

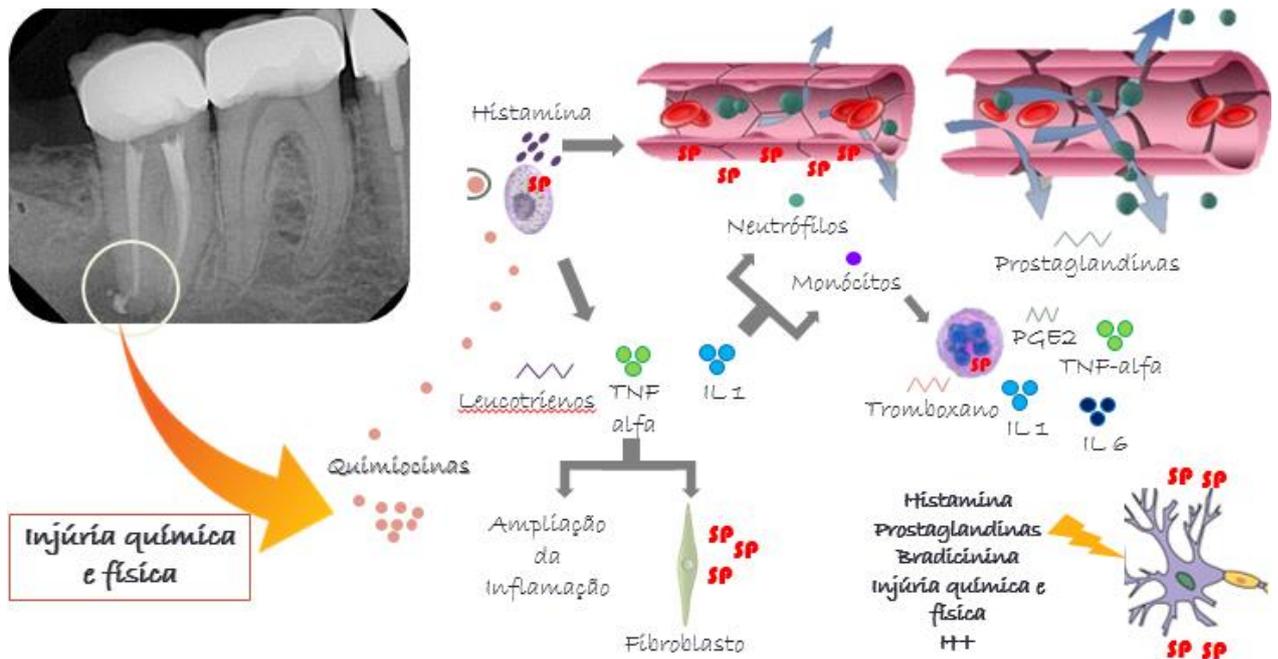
É amplamente aceito que vários fatores podem ativar e/ou sensibilizar os nociceptores em locais de lesões teciduais e a indução da liberação de neuropeptídeos na região (Seybold, 2009) e no tecido periodontal não é diferente. Já foi demonstrado por diversos estudos que estímulos mecânicos, como o trauma oclusal e a movimentação ortodôntica podem induzir a produção de substância P não apenas no tecido pulpar, como também no ligamento periodontal. A liberação de substância P nos tecidos periodontais pode levar a uma mudança no metabolismo tecidual, gerando alterações vasculares, metabólicas e em nervos, diretamente relacionadas à resposta inflamatória (Kvinnslund, Heyeraas e Ofjord, 1989; Kim, 1990; Kvinnslund, Heyeraas e Byers, 1992; Caviedes-Bucheli et al. 2008, 2011).

A interação da substância P com receptores de membrana específicos presentes em células inflamatórias, como linfócitos, granulócitos e macrófagos, em vasos sanguíneos, é capaz de induzir a vasodilatação periférica, o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma, além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1, interleucina 6, fator de necrose tumoral e mediadores como a prostaglandina e o tromboxano, levando também a liberação de nociceptores e assim, a estímulos dolorosos (Moriarty et al., 2001). Esta é a principal função da substância P nos tecidos periapicais.

Assim, a substância P pode ser considerada como um importante mediador da inflamação e hiperalgésia associada a lesões em diversos tecidos e podendo ser o alvo nas terapias destinadas a controlar dor e minimizar consequências deletérias

de lesões a estes tecidos, como no caso do extravasamento de material obturador, produto muitas vezes citotóxico, no espaço do ligamento periodontal. A figura 1 apresenta um esquema de ação da substância P nos tecidos periapicais.

Figura 1. Esquema representativo da produção de substância P nos tecidos periapicais e a cascata de eventos que sucede a liberação deste neurotransmissor.



Diversos artigos da literatura demonstram que vários tipos de estímulos nocivos são capazes de estimular a produção de substância P por células do ligamento periodontal.

Em 2010, Caviedes-Bucheli et al., estudaram o efeito da instrumentação com três tipos diferentes de sistemas rotatórios na liberação de substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC) no ligamento periodontal humano. Eles concluíram que a expressão de substância P e do PRGC no ligamento periodontal aumenta quando os dentes são instrumentados com os sistemas rotatórios ProTaper Universal e Race, bem como com a instrumentação manual. Contudo, as limas do sistema rotatório Mtwo mantêm os níveis de substância P e PRGC similares aos do controle negativo (Caviedes-Bucheli et al., 2010b).

Já no ano de 2011, estes pesquisadores avaliaram a expressão de substância P em células da polpa dental e do ligamento periodontal de dentes

submetidos ao trauma oclusal. Os autores concluíram que tal interferência aumentou a expressão de substância P na polpa e no ligamento periodontal, e que as respostas destes tecidos ao trauma oclusal podem ser mediadas por este neuropeptídeo através de sua interação com o receptor NK1 constituindo uma potencial explicação para as mudanças inflamatórias e degenerativas que ocorrem nestes tecidos (Caviedes-Bucheli et al.,2011).

No ano de 2013, Caviedes-Bucheli et al. verificaram o efeito da instrumentação recíproca na liberação de substância P e PRGC em células do ligamento periodontal e concluíram que houve um aumento na produção de substância P e de PRGC quando os dentes foram instrumentados com limas do sistema WaveOne (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, EUA), bem como através da instrumentação manual. Contudo, instrumentos do sistema Reciproc (VDW, Munique, Alemanha) mantiveram os níveis de substância P e PRGC similares aos do controle negativo (Caviedes-Bucheli et al.,2013).

A relação estreita entre o ligamento periodontal e a polpa tem sido considerada como sinérgica. Assim, uma vez que os tecidos periodontais são acometidos pela inflamação decorrente de estímulos mecânicos, a inflamação é rapidamente dissipada para a polpa dentária. Da mesma forma, qualquer inflamação que inicialmente afete a polpa será dissipada para os tecidos periodontais. Este tipo de inflamação é de natureza neurogênica porque o sistema nervoso controla tanto o sistema vascular quanto as respostas do sistema imunológico (Caviedes-Bucheli et al., 2016).

Por conseguinte, verifica-se que é viável a hipótese de que materiais obturadores, que possuem potencial de injúria química e física, sejam capazes de sensibilizar as células do ligamento periodontal para a produção de substância P.

2.7 Dor pós-operatória e extravasamento de material obturador

Um problema frequente na endodontia é a dor pós-operatória, que pode variar desde uma sensibilidade de baixa intensidade ao morder sobre o dente, até uma dor severa diante de um leve toque. Podem ser diversas as causas para tal sintomatologia, sendo estas iatrogênicas ou não. Fatores como a

sobreinstrumentação, o extravasamento de irrigantes, extrusão bacteriana e até a sobreextensão e a sobreobturação podem desencadear o desenvolvimento da dor pós-operatória, podendo inclusive gerar um *flare-up* (Reddy e Hicks, 1998; Ferraz et al., 2001; Siqueira, 2003; Er, Sumer, Akpinar, 2005; Leonardi, Atlas e Raiden, 2007; Sipaviciute e Maneliene, 2014).

Embora, alguns autores relatem a possibilidade de dor pós-operatória em casos de sobreobturação e/ou sobreextensão (Siqueira Jr, 2003; Sipaviciute e Maneliene, 2014), outros autores não corroboram com tal afirmação (Sadaf e Ahmad, 2014).

No ano de 2003, Siqueira Jr publicou uma revisão de literatura, onde relatava os fatores microbiológicos causadores de *flare-up* e de dor pós-operatória. Neste estudo foi apontado a extrusão de debris contaminados como uma das causas desta sintomatologia, sendo decorrente tanto de sobreinstrumentação, como de sobreobturação (Siqueira Jr, 2003).

Em 2014, Sipaviciute e Maneliene escreveram uma revisão sobre dor e *flare-up* após o tratamento endodôntico. Eles ressaltaram que a dor após o tratamento endodôntico pode ser ocasionada não apenas pela extrusão de substâncias irrigadoras ocasionadas pela sobreinstrumentação, como também pela extrusão de materiais obturadores (Sipaviciute e Maneliene, 2014).

Em contrapartida, em 2014, Sadaf e Ahmad avaliaram os fatores relacionados a dor pós-operatória em uma pesquisa clínica com 140 pacientes indicados para tratamento endodôntico. Eles concluíram que nem o nível da obturação ou a extrusão de cimento endodôntico apresentaram-se relacionados à dor pós-operatória (Sadaf e Ahmad, 2014).

O sucesso a longo prazo no tratamento endodôntico é diretamente relacionado à obturação tridimensional do canal radicular. O preenchimento incompleto do espaço do canal é uma das principais causas de falha na endodontia (Gulabivala e Leung, 1994), sendo o selamento apical através de uma leve sobreextensão na obturação (também conhecida como “puff” ou “flow”) um importante fator contribuinte para o sucesso do tratamento, pois promovem o selamento dos

forames apicais. Evidências indicam que a sobreextensão de materiais obturadores não parece ter correlação com o insucesso do tratamento endodôntico, uma vez que seja estabelecido um ambiente no qual não haja infecção (Sjogren et al., 1997; Bystrom et al., 1987).

Através do selamento apical adequado, busca-se a promoção de um ambiente biologicamente favorável ao reparo ou prevenção das lesões perirradiculares impedindo a micro-infiltração do exsudato perirradicular para o interior do canal e evitando que micro-organismos tenham acesso aos tecidos periodontais apicais, através do aprisionamento de espécies remanescentes, resistentes aos procedimentos limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares, ou inacessíveis nos túbulos dentinários (Sundqvist et al., 1998; Figdor e Sundqvist, 2007).

Apesar de haver certo receio por parte de endodontistas sobre o contato dos cimentos endodônticos com os tecidos periapicais, estes podem ser considerados seguros por desencadearem, na maioria das vezes, reação inflamatória transitória (Bodrumlu, 2008; Gomes- Filho 2007; Kaplan et al., 2003).

Quando os materiais obturadores são extruídos, seu destino dependerá de sua solubilidade nos fluidos e de sua susceptibilidade à fagocitose similarmente sua influência no prognóstico do tratamento dependerá diretamente de sua biocompatibilidade. Já foi sugerido na literatura que as menores taxas de cura periapical associadas à sobreobturação resultam da citotoxicidade dos materiais ou de uma inflamação imune do tipo corpo estranho (Nair et al., 1990; Ricucci et al., 2009)

Neste contexto, a produção de substância P decorrente do extravasamento de material obturado permanece desconhecida, já que, ainda não há trabalho publicado que quantificasse ou verificasse a produção de substância P por células do ligamento periodontal, induzidos pelo extravasamento de material obturador.

2.8 Citotoxicidade dos materiais obturadores

A maioria dos tratamentos endodônticos promovem o preenchimento do sistema de canais radiculares com guta-percha em combinação com um cimento endodôntico que são componentes essenciais da obturação para estabelecer uma

vedação estanque a fluidos. A principal função do cimento endodôntico é preencher os espaços entre o núcleo da obturação (guta-percha) e as paredes do canal radicular, em uma tentativa para formar uma massa única de material obturador sem espaços vazios (Chhabra et al., 2011). É esperado que o cimento preencha as irregularidades e pequenas discrepâncias entre a gutapercha e as paredes dos canais principal, canais acessórios e deltas apicais. Por sua ação bactericida, também é esperado que o cimento endodôntico destrua bactérias remanescentes do preparo químico-mecânico (Grossman, 1958). Devido a possível extrusão dos cimentos obturadores além do forame apical, estes materiais, por vezes, permanecem em contato íntimo com o tecido periapical por um período prolongado e, por isso, a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos é um importante fator a ser considerado pelo endodontista na escolha do material a ser usado. Os cimentos endodônticos que podem ser encontrados atualmente são à base de óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, dimetil polissiloxano, resina epóxi, cimentos à base de silicato de cálcio e biocerâmicos. Eles exibem graus variáveis de citotoxicidade e a maioria desses cimentos exerce algum efeito tóxico (Schwarze, Leyhausen e Geurtsen, 2002; Brackett et al., 2009; Silva et al., 2012; Silva, Santos e Zaia, 2013; Silva et al. 2015). A variabilidade nos tipos destes materiais surgiu através da necessidade de encontrar-se cimentos com propriedades físicas, químicas e biológicas desejáveis.

Os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol possuem atividade antibacteriana, efeito anestésico e anti-inflamatório devido ao eugenol. No entanto, o eugenol também apresenta citotoxicidade e, em baixa concentração, inibe a atividade nervosa de forma reversível. O extravasamento de uma grande quantidade deste cimento para os tecidos perirradiculares permite uma maior difusão de eugenol, que tende a exercer suas propriedades deletérias, podendo interferir negativamente no processo de reparo tecidual (Lopes e Siqueira, 2015). São encontrados na literatura diversos relatos sobre o potencial citotóxico deste tipo de cimento (Trichês et al., 2013).

Trichês et al., em 2013, constataram reação inflamatória do tecido subcutâneo de ratos expostos a um cimento à base de óxido de zinco e eugenol, o Endomethasone N (Septodont, Saint Maur des Fosses, França), quando comparado a outro cimento à base de óxido de zinco e eugenol, o Endofill (Dentsply, Petrópolis,

Brasil) ou ao Sealer 26 (Dentsply Detrey, Konstanz, Alemanha), à base de hidróxido de cálcio. Foi concluído neste estudo que os cimentos são irritantes, mas também que sua toxicidade diminuiu com o tempo, independentemente do cimento analisado. Também constatou-se que os cimentos endodônticos à base óxido de zinco e eugenol são tão bem tolerados pelo tecido quanto o cimento a base de hidróxido de cálcio (Trichês et al.,2013).

Em 2015, Javidi et al., avaliaram a citotoxicidade de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol nanoparticulado, comparando-a com ao cimento Pulpodent (Pulpdent, Watertown, MA, EUA), também à base de óxido de zinco e eugenol e ao cimento AH-26 (Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha), à base de resina epóxi. Segundo os resultados pode-se concluir que o cimento nanoparticulado possuía citotoxicidade similar ao Pulpodent e inferior ao cimento AH-26 (Javidi et al., 2015).

Já os cimentos a base de hidróxido de cálcio são preconizados, principalmente, devido aos efeitos biológicos benéficos associados à sua composição base. Porém, no sentido físico-químico, o hidróxido de cálcio em si apresenta alguns inconvenientes, uma vez que não é radiopaco, tem pouco escoamento, não apresenta viscosidade, é permeável e solubilizado com o tempo (Lopes e Siqueira, 2015). Como já foi dito, devido às suas excelentes propriedades biológicas, este cimento apresenta boa biocompatibilidade, apesar de sempre ser relatada alguma resposta inflamatória (Trichês et al., 2013; Konjhodzic-Prcic et al., 2015).

No ano de 2015, Konjhodzic-Prcic et al., realizaram um estudo *in vitro* avaliando a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos em linhagem celular de fibroblastos humanos por meio de análise da viabilidade celular. Neste estudo, o cimento à base de hidróxido de cálcio apresentou viabilidade celular de 95,6% após 24 horas, 89,6% ao fim de 48 horas e 92,1% a 97,6% ao fim dos sete dias, o que aponta que este cimento é ligeiramente citotóxico. Concluiu-se que todos os quatro cimentos testados demonstraram efeitos de citotoxicidade diferentes nas culturas de fibroblastos gengivais humanos, mas, em todas, a citotoxicidade era leve (Konjhodzic-Prcic et al., 2015).

Escassos e conflitantes são os estudos avaliando as propriedades dos cimentos a base de dimetil polissiloxano (Lopes e Siqueira, 2015), o principal

representante desta classe de materiais é o cimento Guttaflow 2 (Coltène/ Whaledent, Langenau, Germany). Contudo, pôde-se encontrar alguns trabalhos que apresentam a avaliação de sua citotoxicidade (Bouillaguet et al., 2006; Silva et al., 2015).

No ano de 2006, Bouillaguet et al., avaliaram a citotoxicidade de três tipos diferentes de cimentos endodônticos (resina epóxi, poliéster e silicone) e constataram que a maioria dos materiais apresentaram algum risco citotóxico e que a citotoxicidade geralmente aumentou com tempo. Após 72 horas de presa, o cimento à base de dimetil polissiloxano apresentou-se significativamente menos tóxico quando comparado aos outros materiais (Bouillaguet et al., 2006).

Em 2015, Silva et al., compararam a citotoxicidade, a atividade gelatinolítica e os níveis de metaloproteína 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) em fibroblastos 3T3, após estimulação com um cimento à base de dimetil polissiloxano (Guttaflow 2) e outro de resina epóxi (AH Plus). Os resultados demonstraram que Guttaflow 2 não apresentou efeitos citotóxicos e não induz a expressão de MMP-2 e MMP-9 (Silva et al., 2015).

Os cimentos a base de resina epóxi em geral possuem boa capacidade seladora apical e excelente comportamento histológico, permitindo o selamento biológico pela deposição de tecido cementóide (Lopes e Siqueira, 2015). No entanto, encontram-se diversos estudos relatando a citotoxicidade deste cimento (Er et al., 2017; Collado-González et al., 2017).

Em 2012, Ashraf et al. apresentaram um estudo onde o objetivo foi avaliar a citotoxicidade de três cimentos à base de resina epóxi, que não demonstraram diferenças significativas entre a viabilidade celular nas culturas de fibroblastos expostos aos diferentes cimentos (Ashraf et al, 2012).

Em 2013, Silva et al., analisaram sete tipos diferentes de cimentos na viabilidade de fibroblastos. Eles concluíram que os cimentos endodônticos avaliados apresentaram diferentes graus de citotoxicidade, principalmente quando recém manipulados. Os cimentos à base de silicone não apresentaram efeitos citotóxicos quando recém-misturados e nos outros tempos de presa avaliados. O cimento à base de agregado trióxido mineral (MTA) foi associado à menor viabilidade celular, quando comparado aos outros cimentos, sendo assim, considerado o mais citotóxico. O

cimento à base de resina epóxi apresentou boa biocompatibilidade (Silva et al., 2013a).

Os cimentos à base de silicato de cálcio, inicialmente eram compostos apenas por aqueles derivados do MTA. Em geral apresentavam selamento marginal de longa duração, alta radiopacidade e capacidade de estimular a formação de tecido duro no ápice, baixa expansão de presa, baixa solubilidade nos tecidos e tempo de trabalho apropriado (Lopes e Siqueira, 2015). Na literatura, encontram-se diversos relatos sobre o principal representante desta classe de materiais, o MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil) como não possuindo boa compatibilidade biológica com o tecido periapical, apresentando, geralmente, uma baixa taxa de viabilidade celular (Silva, Santos e Zaia, 2013a; Silva et al., 2013b; Assmann et al., 2015).

Em 2013, Silva et al. avaliaram as propriedades físico-químicas do MTA Fillapex e de um cimento à base de resina epóxi. Em todos os tempos de presa testados o cimento à base de MTA mostrou-se mais citotóxico do que o cimento resinoso.

Em relação aos cimentos biocerâmicos, que também são à base de silicato de cálcio, ainda são materiais novos e, por isso, poucas informações concretas sobre suas propriedades biológicas estão disponíveis, sendo o EndoSequence BC Sealer (Brasseler, Savannah, GA, EUA) o principal representante desta classe.

Candeiro et al., em 2015, avaliaram algumas características do cimento biocerâmico EndoSequence BC Sealer e quando a citotoxicidade foi avaliada, em uma cultura de fibroblastos, os autores concluíram que, comparado ao AH Plus, este cimento foi menos citotóxico.

Em 2016, Silva et al., avaliaram a citotoxicidade dos cimentos à base de silicato de cálcio, EndoSeal (Maruchi, Wonju, Coréia) e EndoSequence BC Sealer (Brasseler, Savannah, GA, EUA) comparando-os com o MTA Fillapex, material considerado como controle positivo e com o AH Plus, considerado padrão ouro e pouco citotóxico. Os resultados demonstraram que os cimentos Endoseal, EndoSequence BC sealer e o AH Plus foram bem tolerados pela linhagem celular de fibroblastos (Silva, Zaia e Peters, 2016a).

A guta percha, por sua vez, é o material sólido mais utilizado para obturação do sistema de canais radiculares. A literatura demonstra que este material é bem tolerado pelos tecidos perirradiculares (Lopes e Siqueira, 2015). Os casos onde o cone de guta percha ultrapassa os limites do forame apical, pode ocorrer a formação de cápsula fibrosa envolvendo ou, em casos onde o calibre do cone é muito pequeno, é possível que ele seja reabsorvido por macrófagos ou que haja sua solubilização.

3 PROPOSIÇÃO

As finalidades desta pesquisa encontram-se fundamentadas nos seguintes objetivos:

3.1 Objetivo geral

O objetivo precípua foi avaliar a expressão do neuropeptídeo substância P e de seu receptor NK-1 em fibroblastos da linhagem MRC-5 cultivadas na presença de extratos dos cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply International Inc., York, PA, EUA), Endométhasone N (Septodont, Saint Maur des Fosses, França), Endoseal (Maruchi, Wonju, Coréia) e MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil).

3.2 Objetivos específicos

- I. Verificar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos supracitados através do ensaio de captação do corante Tetrazoliun (atividade metabólica mitocondrial), para a verificação da porcentagem de células viáveis em cada uma das diluições dos extratos destes cimentos;
- II. Quantificar a substância P, presente no meio de cultura dos fibroblastos expostos aos extratos de diferentes cimentos endodônticos por meio do ensaio de ELISA.
- III. Verificar o nível de expressão dos genes TAC1 e TACR1 em fibroblastos expostos aos extratos de diferentes cimentos endodônticos por meio do método da PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais Endodônticos

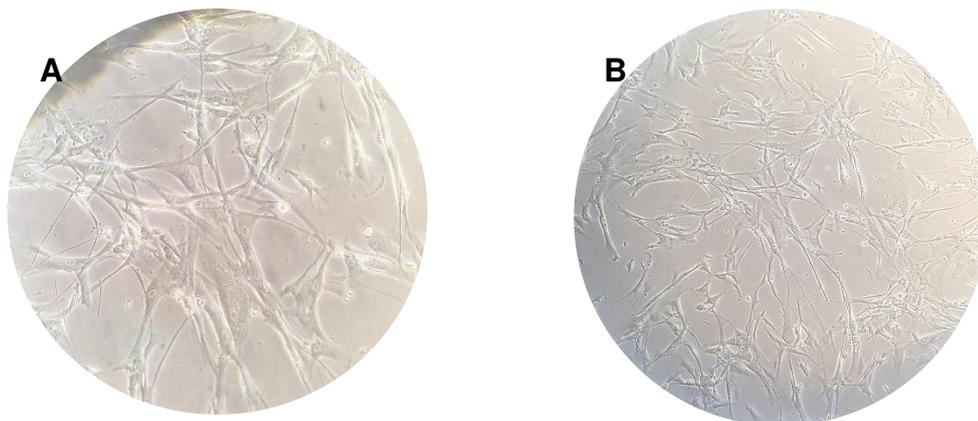
Os cimentos endodônticos utilizados foram: AH Plus, Endométhasone N, Endoseal e MTA Fillapex. Foram preparados discos de cada material sob condições assépticas em um molde de silicone estéril e inerte, com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, utilizando-se uma razão entre a superfície do cimento e o volume do meio de aproximadamente 150 mm²/mL, conforme recomendação da normal ISO 10993-12. O material excedente foi removido com uma lâmina de bisturi estéril. Os materiais foram acondicionados por 24 horas em estufa a 37^o C, para que tomassem presa e fosse possível realizar a remoção dos moldes de silicone. Após a remoção foi realizada o extrato dos diferentes cimentos endodônticos em meio Dulbecco's modified Eagle's médium – DMEM (PAA, Alemanha) com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C em um estufa de CO₂ (5% CO₂). Durante a produção dos extratos, os materiais permaneceram em uma temperatura constante de 37^o C por 24h.

4.2 Células e meio

Neste estudo foram utilizados fibroblastos da linhagem MRC-5 (Figura 2). Estas células foram inicialmente cultivadas em meio DMEM com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C em uma estufa de CO₂ (5% CO₂) em garrafas de 75cm² até que atingissem pelo menos 80% de confluência. Um total de 3x 10⁵ células e 1x10⁵ células foram cultivadas em cada poço de uma placa de cultura com 6 poços e de 24 poços respectivamente. As placas de 6 poços foram utilizadas quando a cultura celular era realizada com o objetivo de fornecer amostras para a realização do ensaio de Elisa e para o PCR em tempo real. Já a placa de 24 poços foi utilizada para a realização do ensaio de captação do corante Tetrazoliun (atividade metabólica mitocondrial). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade dessas células confirmada com corante azul de tripan (Sigma, EUA). As células foram plaqueadas 24 horas antes de iniciar o experimento, para formação de uma monocamada celular com aproximadamente 80% de confluência. Após as 24 horas as células foram expostas aos extratos dos materiais obturadores por um

período adicional de 24 horas. O controle negativo foi a linhagem celular sem a exposição ao extrato de nenhum material obturador endodôntico.

Figura 2. Fibroblastos da linhagem MRC-5 em aumento de 20x: A. Fibroblastos em aumento de 10x: B.



4.3 Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)

A avaliação de citotoxicidade foi realizada de acordo com as normas de padrão internacional ISO 10993-5. Inicialmente, diluições seriadas dos extratos dos cimentos com meio de cultura foram realizadas previamente à exposição aos fibroblastos, sendo elas: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 e 1:16. As células já haviam sido cultivadas nas condições expostas no tópico anterior. A atividade mitocondrial foi quantificada a partir do *MTT Assay Kit* (ATCC, Virgínia, EUA). Este ensaio foi realizado com o objetivo de obter-se a porcentagem de células viáveis em cada uma das diluições dos extratos.

Após o contato das células com os extratos dos materiais obturadores, o meio foi aspirado e as células foram lavadas 2 vezes com 1ml de PBS estéril. Foi adicionado a todos os poços 1 ml da solução de MTT (0,5mg/ml). Após a incubação por 2h, foi retirada toda a solução de MTT e foi adicionado a todos os poços 500 µl de DMSO estéril. As placas foram agitadas por 5 minutos e foram deixadas descansar por mais 5 minutos para a estabilização da cor, protegidas de luz. Foram, então, retiradas alíquotas de 100µl de cada uma das amostras, as quais foram transferidas

para uma placa de 96 poços para a leitura no leitor de microplaca. A absorbância foi medida em 540 nm. Todo este procedimento foi realizado em triplicata.

4.4 Determinação das porcentagens de viabilidade celular

Os valores de densidade ótica obtidos pelo ensaio captação do corante Tetrazolium foram convertidos em percentuais de vitalidade celular referente ao grupo controle. Assim, foi possível obter-se a porcentagem de células vivas em cada uma das cinco diluições dos cimentos avaliados.

4.5 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os fibroblastos da linhagem MRC-5 foram então novamente cultivados sob as especificações já citadas no item 4.1. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços 24 horas antes de iniciar o experimento, para formação de uma monocamada celular com aproximadamente 80% de confluência. Após as 24 horas as células foram expostas aos extratos dos materiais obturadores nas diluições 1:4 e 1:8, por um período de 24 horas. Estas diluições foram selecionadas, pois nelas apresentou-se viabilidade celular superior a 50% em três dos quatro cimentos testados, sendo assim, haveria células para a produção da substância P, porém também existiria uma condição de toxicidade por parte dos materiais. Após este período o meio de cultura foi coletado e armazenado em criotubos em um freezer sob a temperatura de -80°C para posterior realização do ensaio ELISA com o kit específico (R&D Systems, Minneapolis, MN), ID KGE007, para detectar substância P de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 PCR em tempo real

4.6.1 Extração do RNA

A extração dos RNAs totais das amostras foi realizada de acordo com o método do Trizol (Invitrogen) com algumas modificações. Basicamente, cada amostra foi homogeneizada com 1µL de glicogênio (20µg/µL) e em seguida incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta incubação foi adicionado 160µL de clorofórmio e após centrifugação por 5 minutos para separar as fases, a fase superior, que contém o RNA, foi transferida para outro tubo. A partir desta etapa foi utilizado o

protocolo kit de extração de RNA *PureLink RNA Mini Kit* (12183018 A; Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, todos os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro Bio-Spec-mini (Shimadzu).

4.6.2 Síntese de cDNA

Para a confecção das moléculas de cDNA, 0,3µg de RNA total foi submetido à ação da enzima *SuperScript IV* utilizando o *First Stand Synthesis System kit* conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, a 10 µL de RNA de uma solução de RNA e água DEPC foi adicionado 1µL de *primer* Oligo dT (500µg/mL), 1µL de Random Primer e 1µL de dNTPs (10mM) (*Invitrogen*). Essa mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4µL de 5x SS IV *Buffer*, 1µL de DTT (0,1M), 1 µl de Ribonuclease Inhibitor e 1µL de Super Script IV reverse transcriptase (200U/µL) seguido de incubação por 10 minutos a 23°C, 10 minutos a 55°C e de 10 minutos adicionais a 80°C. Foi adicionado 1µl de RNaseH a por 20min a 37°C. Terminada a reação, o produto da síntese foi diluído 10X pela adição de 180µL de água livre de RNase.

Como controle de qualidade dos cDNA foi amplificado um fragmento do gene *ACTB* (NM 001101), com a utilização dos *primers* *ACTB-F* (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3') e *ACTB-R* (5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC -3'). Para isto foram utilizados 2µL de cDNA diluído, 2,5µL de tampão de reação 10X; 1µL de MgCl₂ (50mM); 5µL de dNTPs (10mM) (*Invitrogen*); 0,25 µL de cada *primer* (20µM) e 1U de *Taq DNA Polymerase Platinum* (*Invitrogen*) em um volume final de reação de 25µL. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de alongamento final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado pelo GelRed.

4.6.3 Quantificação da expressão gênica por meio de PCR em tempo real

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho *Quantstudio 7 PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) para os genes TAC1 e TACR1. Os ensaios TaqMan utilizados foram ID Hs00243225_m1 para TAC1 e HS 00185530_m1 para TACR1 (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume total de 20 μ L contendo 2 μ L da solução de cDNAs, 7,0 μ L de água, 10 μ L de 2x PCR Master Mix ABI (Applied Biosystems) e 1,0 μ L de cada ensaio TaqMan.

As condições de amplificação utilizadas foram: 50°C por 2min, 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Para o cálculo da quantificação relativa do nível de expressão foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou método comparativo de Ct é uma equação matemática onde as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras (controle negativo) e as experimentais (expostas aos extratos dos cimentos), normalizadas por uma referência. Vale destacar que o valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor de ΔCt para as amostras calibradoras.

Para a análise da expressão dos genes TAC1 e TACR1 foi utilizado o gene GAPDH (TaqMan-FAM/MGB) como normalizador. Todas as reações foram realizadas em triplicata, sempre com a presença um controle negativo, reação onde foram adicionados todos os reagentes exceto os cDNAs.

4.7 Análise estatística

Os resultados do ensaio de citotoxicidade foram submetidos ao teste Kolmogorov–Smirnov para testar a normalidade da amostra. Os dados foram então analisados pela análise de variância *one-way* (ANOVA). A diferença estatística entre os grupos foi avaliada utilizando-se o teste de Tukey com o nível de significância estabelecido em 5%. Os dados foram analisados pelo *software* SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

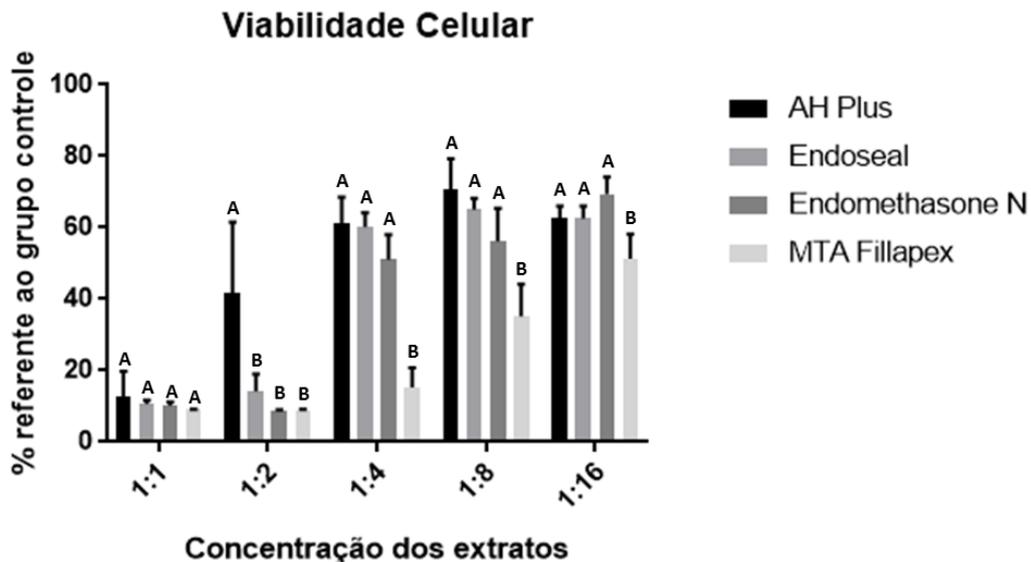
Considerou-se como hipótese nula a ausência de citotoxicidade dos cimentos endodônticos, assim como a não produção da substância P pelos fibroblastos e a expressão normal dos genes TAC1 e TACR1 da linhagem de fibroblastos MRC-5.

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade dos cimentos endodônticos

Todos os cimentos endodônticos avaliados apresentaram efeitos citotóxicos à cultura de fibroblastos MRC-5. Estes efeitos foram dose-dependentes e em níveis distintos para cada tipo de cimento avaliado. O gráfico 1 apresenta os valores dos percentuais das médias e desvio padrões de viabilidade celular após a exposição das células aos extratos dos cimentos.

Gráfico 1 - Média e desvio padrão da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos nas cinco diluições avaliadas.



Legenda: O gráfico 1 apresenta as médias e desvios padrões da viabilidade celular de cada cimento endodôntico nas 5 diluições estudadas. As letras iguais significam ausência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras em um mesmo grupo de diluição avaliado. As letras distintas significam diferença estatisticamente significativa entre as amostras em um mesmo grupo de diluição avaliado.

5.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A produção de substância P foi verificada somente nas amostras do grupo do cimento endodôntico MTA Fillapex, em ambas as concentrações testadas. A tabela 1 apresenta os dados da média e desvio padrão deste grupo nas duas concentrações.

Os outros cimentos endodônticos, assim como o grupo controle negativo, não apresentaram valores de absorbância dentro da faixa de sensibilidade do teste.

Tabela 1 – Média (pg/ml) e desvio padrão da concentração de substância P no meio de cultura exposto ao cimento MTA Fillapex.

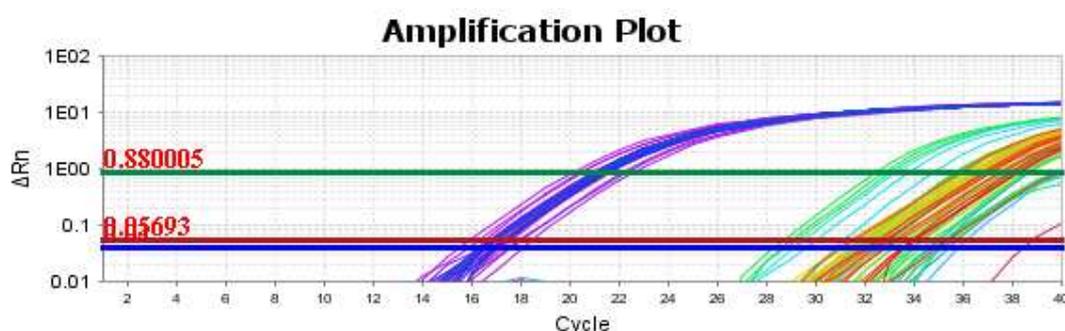
Concentração de substância P no grupo do cimento MTA Fillapex		
	Média (pg/ml)	Desvio Padrão
1:4	503.6	21.8
1:8	152.6	40.5

5.3 Avaliação da expressão gênica

A fim de observar o nível de expressão dos genes TAC1 e TACR1 foi realizado o experimento de PCR em tempo real utilizando-se o sistema *TaqMan* na cultura de fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos nas diluições 1:4 e 1:8. Os resultados são apresentados nos gráficos 2 e 3.

Para a normalização das análises de quantificação relativa da expressão gênica realizadas neste estudo, foi utilizado o normalizador GAPDH em todos os experimentos. Podemos observar na figura 3 que houve a amplificação do normalizador nas amostras tratadas, o que confirma a integridade do cDNA e o sucesso da transcrição reversa:

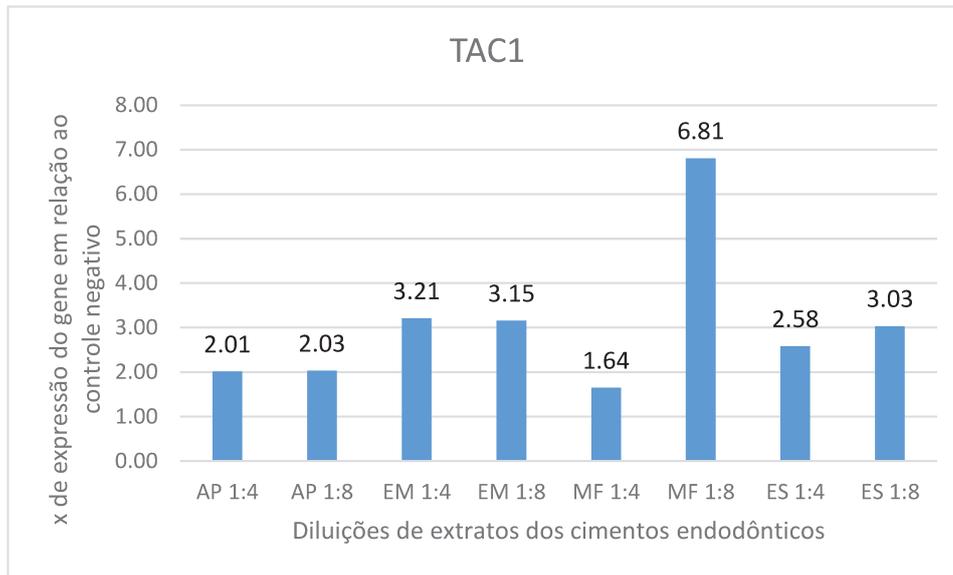
Figura 3- Gráfico de amplificação dos genes TAC1 TACR1 e GAPDH em amostras de fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos e grupo controle negativo.



Legenda: As reações foram realizadas em triplicata. As linhas horizontais representam o *threshold*. As curvas representam amplificação dos genes TAC1 TACR1 e GAPDH em fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos e grupo controle negativo. As linhas em tons de azul e lilás são referentes ao GPDH, os tons de verde são referentes ao TAC1 e os tons de vermelho e amarelo são referentes ao TACR1.

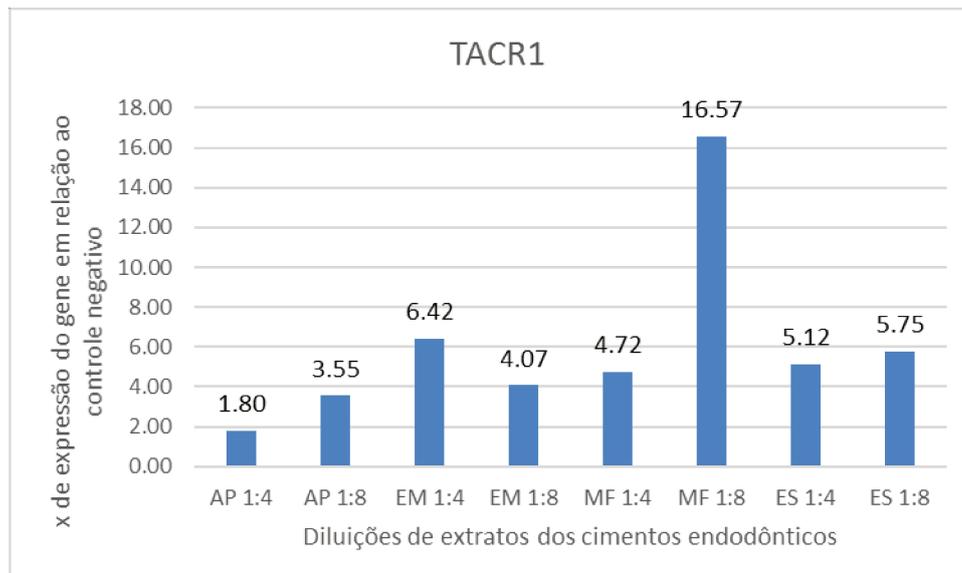
Foi verificada a expressão do gene constitutivo GAPDH em todas as amostras, assim como dos genes TAC1 e TACR1. Como já foi citado no tópico 4.6. em Material e Métodos, o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado para a análise dos resultados, chegando-se aos valores de expressão dos genes representados nos gráficos 2 e 3.

Gráfico 2 - Gráfico de análise da expressão do gene TAC



Legenda: As reações foram realizadas em triplicata. Este gene codifica a substância P e todas as amostras apresentaram expressão elevada significativa em relação ao grupo controle negativo, com exceção da amostra MF 1:4 que representa o cimento MTA Fillapex na diluição 1:4 (1,64x).

Gráfico 3 - Gráfico de análise da expressão do gene TACR1



Legenda: As reações foram realizadas em triplicata. Este gene codifica o receptor NK-1 e todas as amostras apresentaram expressão elevada significativa em relação ao grupo controle negativo, com exceção da amostra AP 1:4 que representa o cimento AH Plus na diluição 1:4 (1,8x).

6 DISCUSSÃO

O limite apical de obturação é um dos assuntos mais controversos na terapia endodôntica (Riccuci, 1998). Historicamente, é preconizado, que os materiais obturadores do sistema de canais radiculares estejam idealmente restritos ao limete do forame apical (Sjogren, 1996, Cailleateau & Mullaney 1997, Schaeffer, White e Walton, 2005). Contudo, eventualmente, o extravasamento de cimento obturador acontece como uma consequência de técnicas limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares que incluem a instrumentação foraminal. Além disso, algumas técnicas de obturação termoplastificada também estão associadas a maior extravasamento de material obturador. Devido, então, à possibilidade do contato direto ou indireto dos cimentos endodônticos com os tecidos apicais e periapicais, justifica-se a investigação sobre a associação destes materiais e a expressão de substâncias relacionadas à fisiologia da dor.

Acredita-se que a substância P é o principal mediador de inflamação de origem neurogênica (Tuncer, Alaçam e Oral, 2004) e assim como na polpa, o ligamento periodontal também é innervado por fibras do tipo C, dessa forma, a mediação da inflamação neste tecido também possui uma origem neurogênica, que promove a liberação de neuropeptídios no tecido. Além disso, já foi comprovado que o principal componente celular do ligamento periodontal, o fibroblasto, é capaz de produzir substância P (Killough, Lundy e Irwin, 2009). Este fato corrobora a presente tentativa de identificar a produção de substância P em uma cultura celular de fibroblastos, após o contato com cimentos endodônticos. Buscou-se desta forma, esclarecer do ponto de vista biológico o papel destes materiais obturadores no metabolismo biológico dos fibroblastos.

A citotoxicidade dos cimentos endodônticos e o efeito destes materiais na produção de substância P foi verificada em fibroblastos da linhagem MRC-5. Uma linhagem celular imortalizada foi utilizada, pois permite uma alta reprodutibilidade dos resultados, além de ser células que se multiplicam rapidamente e possuem vida ilimitada (Schwarze et al. 2002; Bouillaguet et al., 2006; Loushine et al., 2011; Silva et al., 2012). Diversos métodos laboratoriais vêm sendo recomendados para a avaliação da citotoxicidade de materiais endodônticos, através de análises multiparamétricas ou

não, utilizando-se linhagens celulares estabelecidas e culturas primárias (Trubiani et al. 2012). No presente estudo, obteve-se a porcentagem de células viáveis através do ensaio de captação do corante Tetrazolium. Diversos métodos vêm sendo utilizados a fim de avaliar os efeitos citotóxicos dos cimentos endodônticos (Sepet et al., 2009, Silva et al., 2012a; Silva et al., 2012b; Cotti et al., 2014; Candeiro et al., 2015; Collado-González et al., 2016). Neste trabalho, a viabilidade celular foi determinada através do teste com o sal de MTT, que é baseado na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes nas células vivas, em converter o sal amarelo tetrazólio para cristais de formazan lilás. As vantagens deste método são sua simplicidade, velocidade, precisão e elevada reprodutibilidade (Sepet et al. 2009, Malkoc et al. 2010). Apesar de não existir sempre uma correlação positiva entre o número de células viáveis e a redução do sal do MTT, o que é considerado uma das limitações da utilização de apenas um parâmetro para medir a toxicidade de um biomaterial, este teste é amplamente aceito e utilizado em trabalhos com este objetivo na Endodontia (Silva et al., 20015; Candeiro et al., 2015; Silva et al., 2016a; Collado-González et al., 2016). Alguns autores sugerem a realização de ensaios multiparamétricos, com diferentes testes de viabilidade celular (De Deus et al., 2009; Scelza et al., 2012). Esse método pode aumentar a chance de detecção dos efeitos citotóxicos, permitindo a correlação de diferentes parâmetros, o que pode fornecer pistas sobre os mecanismos de toxicidade (De Deus et al., 2009).

Neste trabalho verificou-se que todos os cimentos endodônticos testados apresentaram algum potencial citotóxico, nas concentrações estudadas, rejeitando assim a hipótese de nulidade. Tais resultados corroboram com os encontrados na literatura sobre a biocompatibilidade destes cimentos (Celza et al., 2012; Silva et al., 2013a; Trichês et al., 2013; Silva et al., 2016b; Collado-González et al., 2016; Scelza et al., 2016). É importante ressaltar que esses mesmos estudos comprovam que a citotoxicidade dos cimentos diminui com o passar do tempo de presa, contudo o período selecionado para o presente estudo foi o de 24h afim de simular a reação imediata pós-operatória do ligamento periodontal aos cimentos endodônticos.

O AH Plus foi um dos materiais menos citotóxico dentre os cimentos endodônticos avaliados. Pôde-se observar diferenças estatisticamente significativas entre este cimento e o Endomenthasone N, o Endoseal e o MTA Fillapex na diluição

1:2 e para somente o MTA Fillapex nas concentrações 1:4, 1:8 e 1:16. Já foi reportado na literatura a citotoxicidade moderada deste material, que diminui nos primeiros dias (Silva et al., 2013b;), mas que depois de algum tempo volta a aumentar (Bouillaguet et al., 2006; Konjhodzic-Prcic et al., 2015;). Contudo, este material apresentou uma citotoxicidade bastante elevada na diluição 1:1. O AH Plus é um cimento resinoso que de acordo com o fabricante é livre de formaldeído. Contudo, um estudo *in vitro* relatou que este material poderia liberar quantidades mínimas, porém detectáveis, de formaldeído (Leonardo et al., 1999). Este resultado pode ser atribuído não apenas a possível liberação de formaldeído, como também de aminas e resinas epóxi contidas neste material endodôntico (Miletic et al., 2005; Huang et al., 2008; Silva et al., 2012a, Silva et al., 2015).

O MTA Fillapex foi o material que apresentou a maior citotoxicidade na maioria das diluições avaliadas. A baixa biocompatibilidade deste material já foi bastante relatada na literatura (Silva et al., 2013a; Silva et al., 2016a; Baraba et al., 2016). Este cimento endodôntico apresentou citotoxicidade estatisticamente superior ao AH Plus, o Endoseal e o Endomethasone N nas diluições 1:4, 1:8 e 1:16. Porém não houve diferença estatisticamente significativa entre o MTA Fillapex, o Endoseal e o Endomethasone N nas diluições 1:1 e 1:2. Logo, os achados do presente estudo vão de encontro com diversos trabalhos já publicados. Os componentes presentes na formulação MTA Fillapex, tais como resina de salicilato, resina de diluição e a sílica, podem estar relacionados com tais resultados. Além disso, MTA Fillapex provavelmente tem uma proporção desequilibrada entre resinas e MTA, com valores menores de MTA em sua composição. Sendo assim, esta relação resina / MTA desequilibrada e a dificuldade de reação de presa podem explicar a maior citotoxicidade e as propriedades de tempo de presa prolongado, de tempo de trabalho, fluidez excessiva apresentadas por este material (Vitti et al., 2013; Silva et al., 2013b; Amoroso-Silva et al., 2014; Assmann et al., 2015; Silva et al., 2016c).

O Endoseal é um material obturador ainda pouco estudado na endodontia (Kim e Shin, 2014; Lim et al., 2015). Ele também possui MTA em sua composição, assim como o MTA Fillapex, contudo, este cimento endodôntico não é composto por resinas, o que possivelmente é responsável pelos melhores resultados nos testes de citotoxicidade deste material, como os encontrados no presente estudo e no estudo

de Lim et al., (2015). O Endoseal apresentou resultados melhores aos do AH Plus em trabalho de Kim e Shin (2014), resultado que se opõe aos nossos achados, já que o Endoseal não apresentou diferença estatística significativa em relação ao AH Plus em quatro das cinco diluições avaliadas, sendo, inclusive, mais citotóxico na diluição 1:2.

O cimento endodôntico Endomethasone N apresentou uma biocompatibilidade semelhante ao Endoseal. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois materiais em nenhuma das diluições avaliadas. Encontram-se na literatura relatos de uma biocompatibilidade moderada deste material (Silva et al., 2012a; Trichês et al., 2013; Silva et al; 2013a). O Endomethasone N está na categoria óxido de zinco e eugenol e sua toxicidade pode ser atribuída ao eugenol libertado a partir da reação de presa do material. O eugenol pode participar no desenvolvimento de inflamação periapical ou na perpetuação de uma lesão periapical pré-existente (Ho et al., 2006).

É importante salientar que na diluição 1:1 todos os cimentos foram extremamente citotóxicos e que em nenhuma das concentrações estes materiais foram estatisticamente iguais ao grupo controle.

O ensaio de ELISA foi a metodologia de escolha para verificar expressão de substância P pelos fibroblastos da linhagem MRC-5. Após a leitura dos resultados, somente foi possível verificar a expressão desta substância nas amostras expostas ao cimentos endodôntico MTA Fillapex, nas duas concentrações testadas. Os valores de absorbância dos outros grupos de materiais, assim como o do controle negativo não estavam entre os valores apresentados na curva, por isso são valores fora da sensibilidade do teste e por isso foram considerados como zero. Contudo, ainda é possível que pequenas quantidades de substância P tenham sido produzidas, principalmente devido ao fato de que, em condições normais, este neuropeptídeo participa da fisiologia dos tecido, participando de processos como a manutenção do homeostase e do tonus vascular (Caviedes-Bucheli et al. 2008a). Além disso, como foi visto nos resultados do PCR em tempo real, a expressão do gene TAC1, referente a substância P estava aumentada em todos os cimentos endodônticos avaliados, mesmo não tendo sido possível verificar a presença deste neuropeptídeo no meio de cultura destas células.

A concentração de substância P, no grupo do cimento MTA Fillapex, decresceu quando houve maior diluição do cimento no meio (503,6 pg/ml em 1:4 e 152,6 pg/ml em 1:8). Este resultado é esperado, uma vez que quando mais diluído no meio, menor o potencial citotóxico deste material, como comprovado pelo ensaio de citotoxicidade. Logo, devido a menor toxicidade do extrato 1:8 do cimento MTA Fillapex, menor também foi a produção de substância P pelas células.

Tendo como objetivo verificar se extratos dos cimentos endodônticos poderiam induzir o aumento da expressão dos genes TAC1 e TACR1 (genes que codificam a substância P e os receptores NK1, respectivamente) realizou-se a extração do RNA da cultura de fibroblastos, transformando-os em cDNA (molécula mais estável) para então quantificá-lo. Em todas as amostras testadas pôde-se observar um aumento na expressão do gene TAC1 que foi pelo menos 2 vezes mais expresso em relação ao grupo controle negativo, com exceção ao grupo do cimento MTA Fillapex na diluição 1:4 (1,64x).

A baixa expressão deste gene nas amostras MTA Fillapex 1:4, quando comparado aos grupos dos outros cimentos e também ao mesmo cimento na diluição 1:8 pode ser justificada pela baixa porcentagem de células viáveis (somente 15,3%). Sendo assim, apesar de ter sido feita uma compensação após a quantificação do RNA, para que fosse utilizada a mesma quantidade de RNA de cada amostra durante os testes, a quantidade de células viáveis para a expressão deste gene era menor do que nos outros grupos, o que pode gerar um número de moléculas de RNA final menor. Além disso, o fato da expressão do gene TAC1 ter sido elevado em 6,81 vezes nas amostras mais diluídas deste cimento (MTA Fillapex 1:8), onde havia duas vezes mais células viáveis (35,1%) para a produção de RNA da substância P corroboram com esta possibilidade.

No que concerne ao gene TACR1, pôde-se observar um aumento da expressão deste gene em todas as amostras, com exceção do grupo do cimento AH Plus, na diluição 1:4. O aumento da expressão deste gene que proporciona a maior expressão do receptor de membrana NK1 pode indicar um *feedback* positivo da substância P no próprio fibroblasto. A substância P é responsável pela ativação de diversas células pró-inflamatórias, promovendo a liberação de moléculas como

interleucinas e citocinas, além da degranulação de mastócitos e por isso, este feedback positivo pode ser importante de modo a aumentar a concentração de substância P no meio, permitindo também o aumento da resposta inflamatória. Além disso, este *feedback* positivo pode estar relacionado com o processo de reparação tecidual, já que o fibroblasto atua diretamente neste processo, através da liberação de metaloproteinases de matriz, colágeno e outras substâncias.

Inicialmente pensava-se que a expressão de substância P estava limitada à células do sistema nervoso e imunológico, contudo Killough et al., em 2009 comprovou que fibroblastos pulparem eram capazes de produzir substância P e que a produção era regulada por citocinas associadas à injúrias pulpares. O presente estudo corrobora esses achados prévios, demonstrando ainda, que cimentos endodônticos também são capazes de sensibilizar os fibroblastos à produzir substância P. É a primeira vez que esta informação é comprovada na literatura. Já foi demonstrado, contudo, que fatores como a instrumentação do sistema de canais radiculares, o extravasamento de solução irrigadora e o trauma oclusal podem gerar uma resposta de origem neurogênica nas células do ligamento periodontal e assim promover a liberação de substância P (Caviedes-Bucheli et al., 2010b, 2011, 2013).

É importante ressaltar, também, que a dor pós-operatória tem uma origem multi-fatorial, não só um neuropeptídeo pode ser diretamente responsabilizado por este fenômeno, mas sim uma cadeia de eventos biológicos que envolvem uma grande variedade de tipos celulares e diversos mediadores químicos, que resultam em ações diretas e indiretas no sistema nervoso, gerando enfim a sensação dolorosa. Contudo, como já explicado anteriormente, a substância P é um neuropeptídeo que apresenta função central neste processo, principalmente por ampliar a resposta inflamatória no local de uma lesão. Assim, sua produção por fibroblastos, quando estes são sensibilizados por cimentos endodônticos, torna plausível a hipótese de que estes materiais podem ter alguma influência na dor pós-operatória e, ainda, que o tipo de cimento endodôntico utilizado pelo clínico pode influenciar diretamente este fenômeno.

Apesar dos achados deste trabalho, novas pesquisas *in vitro* são necessárias a fim de apresentar mais evidências sobre os processos decorrentes do

contato dos cimentos endodônticos com o tecido periapical, possíveis protagonistas dos eventos celulares e sua real influência na patogênese da dor pós-operatória.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. Os quatro cimentos endodônticos testados tiveram diferentes efeitos citotóxicos aos fibroblastos da linhagem MRC-5, contudo todos os materiais foram citotóxicos em todas as diluições;
2. A produção de substância P foi influenciada pelo contato da cultura de células com o extrato do cimento endodôntico MTA Fillapex.
3. O contato com o extrato dos cimentos endodônticos proporcionou o aumento da expressão dos genes TAC1 e TACR1, exceto nos grupos MTA Fillapex 1:4 e AH Plus 1:4 respectivamente.

REFERÊNCIAS*

Amoroso-Silva PA, Guimarães BM, Marciano MA, Duarte MA, Cavenago BC, Ordinola-Zapata R, Almeida MM, Moraes IG. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microsc Res Tech*. 2014Dec;77(12):1031-6. doi: 10.1002/jemt.22432.

Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PM. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2015 Jan;41(1):62-6. doi: 10.1016/j.joen.2014.09.019.

Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J*. 2002 Jan;35(1):30-6.

Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):31-9.

Baraba A, Pezelj-Ribaric S, Roguljić M, Miletic I. Cytotoxicity of Two Bioactive Root Canal Sealers. *Acta Stomatol Croat*. 2016 Mar;50(1):8-13. doi:10.15644/asc50/1/2.

Barthel CR, Zimmer S, Wussogk R, Roulet JF. Long-Term bacterial leakage along obturated roots restored with temporary and adhesive fillings. *J Endod*. 2001 Sep;27(9):559-62.

Bernáth M, Szabó J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endod J*. 2003 Apr;36(4):256-61.

* De acordo com as normas de UNICAMP/FOP, baseadas na padronização International Committee of Medical Journal Editors – Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod.* 2006Oct;32(10):989-92.

Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2003 Apr;29(4):265-7.

Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J.* 2008; 34(1):30-5.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, Wataha JC. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks In vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Nov;91(2):839-44. doi:10.1002/jbm.b.31465.

Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987 Apr;3(2):58-63.

Cailleateau JG, Mullaney TP. Prevalence of teaching apical patency and various instrumentation and obturation techniques in United States dental schools. *J Endod.* 1997 Jun;23(6):394-6.

Candeiro GT, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, Azambuja-Júnior N, Marques MM, Cai S, Gavini G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J.* 2015 Aug 17. doi: 10.1111/iej.12523.

Caviedes-Bucheli J, Correa-Ortíz JA, García LV, López-Torres R, Lombana N, Muñoz HR. The effect of cavity preparation on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2005 Dec;31(12):857-9.

Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguín MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):394-400.

Caviedes-Bucheli J, Gutierrez-Guerra JE, Salazar F, Pichardo D, Moreno GC, Munoz HR. Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *Int Endod J*. 2007 Feb;40(2):106-11.

Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):773-88. doi:10.1016/j.joen.2008a.03.010.

Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod*. 2008b Dec;34(12):1462-5. doi: 10.1016/j.joen.2008.09.013.

Caviedes-Bucheli J, Correa-Ortiz JA, Ballesteros AC, Jimenez M, Munoz A, Rivero C, Lombana N, Munoz HR. The effect of dentine-bonding agents on substance P release in human dental pulp. *Int Endod J*. 2010a Feb;43(2):95-101. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01646.x.

Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Gutierrez-Sanchez L, Higuerey-Bermudez F, Pereira-Nava V, Lombana N, Munoz HR. The effect of three different Rotary instrumentation systems on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *J Endod*. 2010b Dec;36(12):1938-42. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.043.

Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Correa-Ortiz JA, Aguilar-Mora MV, Pedroza-Flores JD, Ulate E, Lombana N, Munoz HR. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2011 May;37(5):627-30. doi:10.1016/j.joen.2011.02.013.

Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Carreño CP, Delgado R, Garcia DJ, Solano J, Diaz E, Munoz HR. The effect of single-file reciprocating systems on Substance P and Calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *Int Endod J*. 2013 May;46(5):419-26. doi:10.1111/iej.12005.

Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Camelo P, Mejia M, Ojeda K, Azuero-Holguin MM, Abad-Coronel D, Munoz HR. The effect of glass ionomer and adhesive cements on substance P expression in human dental pulp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Nov 1;18(6):e896-901.

Caviedes-Bucheli J, Gomez-Sosa JF, Azuero-Holguin MM, Ormeño-Gomez M, Pinto-Pascual V, Munoz HR. Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with Substance P expression in response to occlusal trauma. *Int Endod J*. 2016 Mar 8. doi: 10.1111/iej.12627.

Chancellor-Freeland C, Zhu GF, Kage R, Beller DI, Leeman SE, Black PH. Substance P and stress-induced changes in macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec29;771:472-84.

Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 2008 Oct;33(10):1970-8. doi:10.1007/s11064-008-9711-z.

Chhabra A, Teja TS, Jindal V, Singla MG, Warring K. Fate of extruded sealer: a matter of concern. *J Oral Health Comm Dent*. 2011;5(3):168-72.

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):88-91.

Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, Llena C, Rodríguez-Lozano FJ. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J*. 2016 Sep 26. doi: 10.1111/iej.12703.

Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, Oñate-Sánchez RE, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Endod.* 2017 Mar 23. pii: S0099-2399(17)30002-X. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.001.

Cotti E, Petreucic V, Re D, Simbula G. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an in vitro study. *J Endod.* 2014Jan;40(1):124-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.038.

De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1387-90. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.022.

Diomedede F, Caputi S, Merciaro I, Frisone S, D'Arcangelo C, Piattelli A, Trubiani O. Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *Int Endod J.* 2014 Sep;47(9):864-72. doi: 10.1111/iej.12230.

Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 1998 Dec;64(6):828-34.

Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 1998 Dec;64(6):828-34.

Ebner K, Sartori SB, Singewald N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr Pharm Des.* 2009;15(14):1647-74.

El Karim IA, Linden GJ, Irwin CR, Lundy FT. Neuropeptides regulate expression of angiogenic growth factors in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2009Jun;35(6):829-33. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.005.

Er K, Sümer Z, Akpınar KE. Apical extrusion of intracanal bacteria following use of two engine-driven instrumentation techniques. *Int Endod J*. 2005 Dec;38(12):871-6

Er K, Ayar A, Kalkan OF, Canpolat S, Tasdemir T, Ozan U. Neurotoxicity evaluation of three root canal sealers on cultured rat trigeminal ganglion neurons. *J Clin Exp Dent*. 2017 Jan 1;9(1):e34-e39. doi: 10.4317/jced.52901.

Feistritzer C, Clausen J, Sturn DH, Djanani A, Gunsilius E, Wiedermann CJ, Kähler CM. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1-3):119-26.

Ferraz CC, Gomes NV, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. *Int Endod J*. 2001 Jul;34(5):354-8.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small-understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S38-51.

Fristad I, Vandevska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa SJ, Hals Kvinnsland I. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res*. 2003 Mar;311(3):383-91.

Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*. 2008 Mar;12(1):1-8.

Gomes AC, Nejaim Y, Silva AI, Haiter-Neto F, Cohenca N, Zaia AA, Silva EJ. Influence of Endodontic Treatment and Coronal Restoration on Status of Periapical Tissues: A Cone-beam Computed Tomographic Study. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1614-8.doi: 10.1016/j.joen.2015.07.008.

Graham GJ, Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brain SD, Lowry PJ, Gibbins JM. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood*. 2004 Aug 15;104(4):1058-65.

Gomes-Filho JE, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CR, Souza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. *J Appl Oral Sci*. 2007 Jun;15(3):186-94.

Grossman LV. An improved root canal cement. *J Am Dent Assoc* 1958;56:381.

Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Jun;33(6):555-76.

Gulabivala K, Leung SF. Review of a new root canal obturation technique. *Dent Update*. 1994 Mar;21(2):73-8, 80-3.

Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):328-36.

Ho YC, Huang FM, Chang YC. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):389-93.

Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*. 2001 Jan;249(1):27-40.

Holland R, Sant'Anna Júnior A, Souza Vd, Dezan Junior E, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Nery MJ, Murata SS. Influence of apical patency and filling material on healing process of dogs' teeth with vital pulp after root canal therapy. *Braz Dent J*. 2005;16(1):9-16.

Huang FM, Yang SF, Chang YC. Up-regulation of gelatinases and tissue type plasminogen activator by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod*. 2008 Mar;34(3):291-4. doi: 10.1016/j.joen.2007.12.021.

International Standards Organization: ISO 10993-12:2012 (E). Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2nd ed. Gêneve: ISO; 2012.

Javed F, Al-Kheraif AA, Romanos EB, Romanos GE. Influence of orthodontic forces on human dental pulp: a systematic review. *Arch Oral Biol.* 2015Feb;60(2):347-56. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.11.011.

Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2003 Aug;36(8):527-32.

Kaur A, Shah N, Logani A, Mishra N. Biototoxicity of commonly used root canal sealers: A meta-analysis. *J Conserv Dent.* 2015 Mar-Apr;18(2):83-8. doi:10.4103/0972-0707.153054.

Kido MA, Ibuki T, Danjo A, Kondo T, Zhang JQ, Yamaza T, Yamashita Y, Higuchi Y, Tanaka T. Immunocytochemical localization of the neurokinin 1 receptor in rat dental pulp. *Arch Histol Cytol.* 2005 Dec;68(4):259-65.

Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J Endod.* 1990 Feb;16(2):48-53.

Kim RJ, Shin JH. Cytotoxicity of a novel mineral trioxide aggregate-based root canal sealer [corrected]. *Dent Mater J.* 2014;33(3):313-8. Erratum in: *Dent Mater J.* 2014;33(4):576.

Killough SA, Lundy FT, Irwin CR. Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):73-7. doi: 10.1016/j.joen.2008.10.010.

Kvinnsland S, Heyeraas K, Ofjord ES. Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow. *Eur J Orthod.* 1989 Aug;11(3):200-5.

Kvinnsland I, Heyeraas KJ, Byers MR. Effects of dental trauma on pulpal and periodontal nerve morphology. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:125-32.

Kohara H, Tajima S, Yamamoto M, Tabata Y. Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide substance P. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(33):8617-25. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.079.

Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arch*. 2015 Feb;69(1):24-7. doi: 10.5455/medarh.2015.69.24-27.

Leonardi LE, Atlas DM, Raiden G. Apical extrusion of debris by manual and mechanical instrumentation. *Braz Dent J*. 2007;18(1):16-9.

Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Aug;88(2):221-5.

Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod*. 2000 Jun;26(6):328-30.

Lim ES, Park YB, Kwon YS, Shon WJ, Lee KW, Min KS. Physical properties and biocompatibility of an injectable calcium-silicate-based root canal sealer: in vitro and in vivo study. *BMC Oral Health*. 2015 Oct 21;15(1):129. doi: 10.1186/s12903-015-0112-9.

Livak, KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

Lopes HP e Siqueira Jr JF. *Endodontia – Biologia e Técnica*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015.

Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2011 May;37(5):673-7. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.003.

Maeno H, Kiyama H, Tohyama M. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993 Apr;18(1-2):43-58.

Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol*. 1995 Jan;45(1):1-98.

Malkoc S, Corekci B, Ulker HE, Yalçın M, Sengün A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. *Angle Orthod*. 2010 Jul;80(4):571-6. doi: 10.2319/092809-537.1.

Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod*. 2005 Apr;31(4):307-9.

Minamino N, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptides*. 1984 Mar;4(2):157-66.

Muñoz M, Rosso M, Casinello F, Coveñas R. Paravertebral anesthesia: how substance P and the NK-1 receptor could be involved in regional block and breast cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(2):601-3. doi:10.1007/s10549-010-0850-y.

Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(12):1820-31.

Muñoz M, Covenas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci*. 2015 Jun;40(2):441-63.

Moriarty D, Selve N, Baird AW, Goldhill J. Potent NK1 antagonism by SR-140333 reduces rat colonic secretory response to immunocyte activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Apr;280(4):C852-8.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod*. 1990 Dec;16(12):589-95.

Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol*. 1994 Sep 8;347(2):249-74.

Olgart L, Kerezoudis NP. Nerve-pulp interactions. *Arch Oral Biol*. 1994;39 Suppl:47S-54S.

Olgart L, Gazelius B, Brodin E, Nilsson G. Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand*. 1977 Dec;101(4):510-2.

Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J*. 2004 Mar;37(3):185-92.

Patel T, Park SH, Lin LM, Chiappelli F, Huang GT. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Oct;96(4):478-85.

Park CK, Bae JH, Kim HY, Jo HJ, Kim YH, Jung SJ, Kim JS, Oh SB. Substance P sensitizes P2X3 in nociceptive trigeminal neurons. *J Dent Res*. 2010 Oct;89(10):1154-9. doi: 10.1177/0022034510377094.

Payan DG. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu Rev Med*. 1989;40:341-52.

Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev.* 1983 Jun;35(2):85-141.

Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides.* 1998 Feb;32(1):1-49.

Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J.* 1995 Jan;28(1):12-8.

Reddy SA, Hicks ML. Apical extrusion of debris using two hand and two Rotary instrumentation techniques. *J Endod.* 1998 Mar;24(3):180-3. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Sep;302(3):839-45.

Ricucci D. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 1. Literature review. *Int Endod J.* 1998 Nov;31(6):384-93.

Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod.* 2009 Apr;35(4):493-502. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. *Endodontology. An Integrated biological and clinical view.* London: Quintessence Publishing. 2013; 239-91.

Ricucci D, Rôças IN, Alves FR, Loghin S, Siqueira JF Jr. Apically Extruded Sealers: Fate and Influence on Treatment Outcome. *J Endod.* 2016 Feb;42(2):243-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.11.020.

Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat.* 2003 Feb;202(2):195-203.

Ruff MR, Wahl SM, Pert CB. Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides*. 1985;6 Suppl 2:107-11.

Sacerdote P, Levrini L. Peripheral mechanisms of dental pain: the role of substance P. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:951920. doi: 10.1155/2012/951920.

Saffroy M, Beaujouan JC, Torrens Y, Besseyre J, Bergström L, Glowinski J. Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. *Peptides*. 1988 Mar-Apr;9(2):227-41.

Samsam M, Coveñas R, Ahangari R, Yajeya J, Narváez JA, Tramu G. Simultaneous depletion of neurokinin A, substance P and calcitonin gene-related peptide from the caudal trigeminal nucleus of the rat during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Pain*. 2000 Feb;84(2-3):389-95.

Sattari M, Mozayeni MA, Matloob A, Mozayeni M, Javaheri HH. Substance P and CGRP expression in dental pulps with irreversible pulpitis. *Aust Endod J*. 2010 Aug;36(2):59-63. doi: 10.1111/j.1747-4477.2009.00186.x.

Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol*. 1994 Jun;10(3):105-8.

Schaeffer MA, White RR, Walton RE. Determining the optimal obturation length: a meta-analysis of literature. *J Endod*. 2005 Apr;31(4):271-4.

Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am*. 1967 Nov:723-44.

Schratzberger P, Reinisch N, Prodingner WM, Kähler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Wiedermann CJ. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3895-901.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod.* 2002a Nov;28(11):749-53.

Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002b Nov;28(11):784-6.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012 Jan;45(1):12-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01941.x.

Scelza MZ, Campos CA, Scelza P, Adeodato CS, Barbosa IB, de Noronha F, et al. Evaluation of Inflammatory Response to Endodontic Sealers in a Bone Defect Animal Model. *J Contemp Dent Pract.* 2016 Jul 1;17(7):536-41.

Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int.* 2009 Sep;40(8):e55-61.

Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 194, pp. 451– 491, 2009.

Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, Bae KS. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Oct;112(4):548-54. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.026.

Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J.* 2012a Jan;45(1):49-56. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01946.x.

Silva EJ, Herrera DR, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J.* 2012b Sep;45(9):815-20. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02038.x.

Silva EJ, Santos CC, Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2013a Jan-Feb;21(1):43-7.

Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013b Feb;39(2):274-7. doi:10.1016/j.joen.2012.06.030.

Silva EJ, Neves AA, De-Deus G, Accorsi-Mendonça T, Moraes AP, Valentim RM, Moreira EJ. Cytotoxicity and gelatinolytic activity of a new silicon-based endodontic sealer. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015 Dec 18;13(4):e376-80. doi:10.5301/jabfm.5000238.

Silva EJ, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Investig.* 2016a Jul 26. [Epub ahead of print].

Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-Term Cytotoxicity, pH and Dissolution Rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J.* 2016b Jul-Aug;27(4):419-23. doi: 10.1590/0103-6440201600735.

Silva EJ, Perez R, Valentim RM, Belladonna FG, De-Deus GA, Lima IC, Neves AA. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: A micro-CT approach. *Int Endod J.* 2016c Mar 22. doi: 10.1111/iej.12636. [Epub ahead of print]

Sipavičiūtė E, Manelienė R. Pain and flare-up after endodontic treatment procedures. *Stomatologija.* 2014;16(1):25-30. Review.

Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003 Jul;36(7):453-63. Review.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990 Oct;16(10):498-504.

Sjogren U. Success and failure in Endodontics. Umea University Odontological Dissertations, Abstract No. 60, 1996; 91-7191-153-7.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306. Erratum in: *Int Endod J* 1998 Mar;31(2):148.

Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy--a five-year retrospective study. *Int Endod J.* 1993 Nov;26(6):321-33.

Snijdelaar DG, Dirksen R, Slappendel R, Crul BJ. Substance P. *Eur J Pain.* 2000;4(2):121-35. Review.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995 Oct;21(10):489-92.

Trantor IR, Messer HH, Birner R. The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on cultured human pulp cells. *J Dent Res.* 1995 Apr;74(4):1066-71.

Trichês KM, Júnior JS, Calixto JB, Machado R, Rosa TP, Silva EJ, Vansan LP. Connective tissue reaction of rats to a new zinc-oxide-eugenol endodontic sealer. *Microsc Res Tech.* 2013 Dec;76(12):1292-6. doi: 10.1002/jemt.22299.

Trubiani O, Cataldi A, De Angelis F, D'Arcangelo C, Caputi S. Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl

methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *Int Endod J*. 2012 Jan;45(1):19-25. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01942.x.

Unger T, Rascher W, Schuster C, Pavlovitch R, Schömig A, Dietz R, Ganten D. Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 1981 Apr 24;71(1):33-42.

V Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*. 1931 Jun 6;72(1):74-87.

Vitti RP, Prati C, Sinhoreti MA, Zanchi CH, Souza E Silva MG, Ogliari FA, et al. Chemical-physical properties of experimental root canal sealers based on butyl ethylene glycol disalicylate and MTA. *Dent Mater*. 2013 Dec;29(12):1287-94. doi: 10.1016/j.dental.2013.10.002.

Walsh DT, Weg VB, Williams TJ, Nourshargh S. Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK1 receptor antagonists and the role of endogenous mediators. *Br J Pharmacol*. 1995 Apr;114(7):1343-50.

Wolf SS, Moody TW, Quirion R, O'Donohue TL. Biochemical characterization and autoradiographic localization of central substance P receptors using [125I]physalaemin. *Brain Res*. 1985 Apr 22;332(2):299-307.

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

Yamaguchi K, Matsunaga T, Hayashi Y. Gross extrusion of endodontic obturation materials into the maxillary sinus: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jul;104(1):131-4.

Yamaguchi M, Ozawa Y, Mishima H, Aihara N, Kojima T, Kasai K. Substance P increases production of proinflammatory cytokines and formation of osteoclasts in dental pulp fibroblasts in patients with severe orthodontic root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 May;133(5):690-8. doi:10.1016/j.ajodo.2006.03.043.

ANEXO 1 - Tabela com os Cimentos endodônticos avaliados e as respectivas composições.

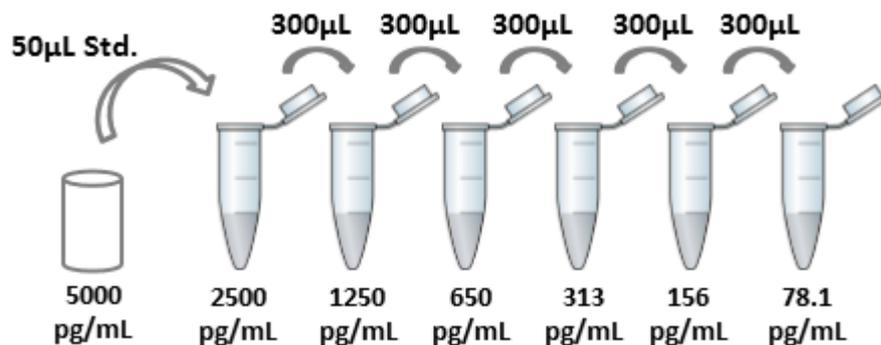
Cimentos endodônticos	Composição
AH Plus, Dentsply, EUA	Pasta A: Resinas epóxi, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, Pigmentos de óxido de ferro, tungstato de aerossol, óxido de zircônio, aerosil Pasta B: amina de Adamantano, N, N-Dibenzil-5-oxanonano, TCD-diamina, cálcio
Endométhasone N, Septodont, França	Pó: acetato de hidrocortisona, iodeto de timol, sulfato de bário, óxido de zinco, estearato de magnésio Líquido: Eugenol
Endoseal, Maruchi, Coreia	Óxido de sódio, óxido de potássio, óxido de cálcio, óxido de magnésio, óxido de ferro, óxido de alumínio, dióxido de titânio, óxido de zircônio, dióxido de silicone
MTA Fillapex, Angelus, Brasil	Resina de salicilato, resina de diluição, resina natural, trióxido de bismuto, sílica nanoparticulada, mta, pigmentos

ANEXO 2 - Protocolo para o processamento das amostras de meio de cultura utilizando o Kit de ELISA específicos para amostras humanas da R&D Systems

Parameter Substance P Assay (R&D catálogo KGE007)

1) Preparo dos reagentes:

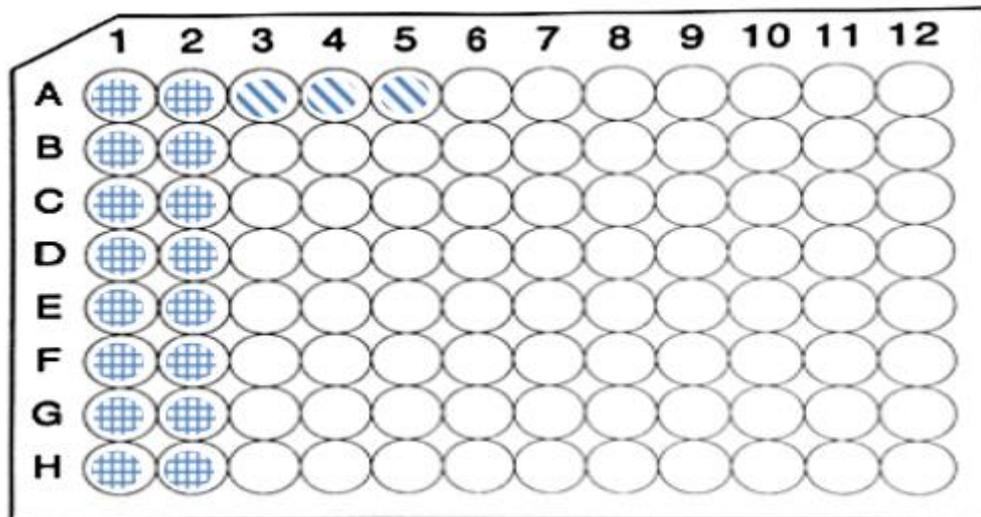
- a) Reconstituir o “Substance P Standard” do kit com 1mL de água deionizada ou destilada. Esta reconstrução produz uma solução estoque de 50.000pg/mL. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições;
- b) Pegar 6 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante;
- c) Pipetar 950µL do “Calibrator Diluent RD5-45” no tubo de concentração 2.500pg/mL;
- d) Colocar 300 µL do “Calibrator Diluent RD5-45” nos 5 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados;
- e) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte;



- f) O “ Calibrator Diluent RD5-45” será o zero padrão da curva (0 pg/mL);

- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 100 µL do “Assay Diluent RD5-45” aos poços NSB da placa.

- 4) Adicionar 50 μL do “Assay Diluent RD5-45” ao poço zero da curva padrão.
- 5) Preencher a placa de 96 poços com 50 μL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

A1 e A2 com 50 μL da diluição 2500 pg/mL

B1 e B2 com 50 μL da diluição 1250 pg/mL

C1 e C2 com 50 μL da diluição 625 pg/mL

D1 e D2 com 50 μL da diluição 313 pg/mL

E1 e E2 com 50 μL da diluição 156 pg/mL

F1 e F2 com 50 μL da diluição 78,1 pg/mL

G1 e G2 com 50 μL da diluição 39 pg/mL

H1 e H2 com 50 μL Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em triplicata, com 50 μL de cada amostra.

- 6) Adicionar 50 μL do anticorpo primário à cada poço com exceção do NSB. Todos os poços vão ficar azul com menos o NSB.
- 7) Adicionar 50 μL do conjugado da Substância P à cada poço. Todos os poços com exceção do NSB vão ficar violetas. Proteger a placa com adesivo.
- 8) Incubar a placa por 3 horas em temperatura ambiente em um vortex de microplaca configurada entre 500 ± 50 rpm.
- 9) Aspirar os poços com cuidado e lava-los, repetindo este processo por 3 vezes, totalizando 4 lavagens. A lavagem deve ser realizada com o "Wash Buffer" (400 μL). Remover todo o líquido à cada repetição é essencial para promover uma boa lavagem. Bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso de líquido à cada lavagem.
- 10) Adicionar 200 μL de "Substrate Solution" à cada poço. Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente protegido de luz.
- 11) Adicionar 50 μL de "Stop Solution" à cada poço. A cor dos poços deve mudar de azul para amarelo.
- 12) Determinar a densidade ótica em cada poço em no máximo 30 minutos usando um leitor de microplaca com o nível de absorbância de luz em 450nm.