

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy” - UNIGRANRIO

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

Universidade Estadual da Zona Oeste - UEZO

**Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina  
Translacional BIOTRANS**

MARJORIE DARDIS MURUCCI

**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NITI *M-WIRE* E MEMÓRIA  
CONTROLADA: AVALIAÇÃO MECÂNICA E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

Duque de Caxias

2020

MARJORIE DARDIS MURUCCI

**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NITI *M-WIRE* E MEMÓRIA  
CONTROLADA: AVALIAÇÃO MECÂNICA E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

Orientadores: PhD Leonardo da Cunha Boldrini Pereira e PhD Victor Talarico Leal Vieira.

Duque de Caxias

2020

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

M984i Murucci, Marjorie Dardis.

Instrumentos endodônticos de NiTi M-wire e memória controlada: avaliação mecânica e da citotoxicidade in vitro/ Marjorie Dardis Murucci. – Duque de caxias, 2020.

52 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2020.

“Orientadores: Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.  
Prof. Dr. Victor Talarico Leal Vieira”.

Referências: f. 47-52

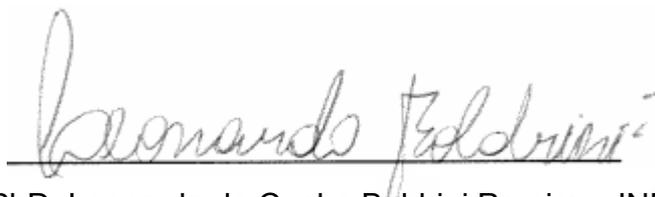
1. Biomedicina. 2. Odontologia. 3. Endodontia. 4. Nitinol. 5. Citotoxicidade. I. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. II. Vieira, Victor Talarico Leal. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”.

MARJORIE DARDIS MURUCCI

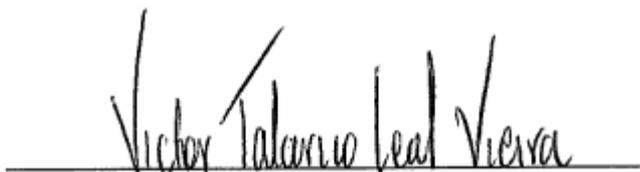
**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NITI *M-WIRE* E MEMÓRIA  
CONTROLADA: AVALIAÇÃO MECÂNICA E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

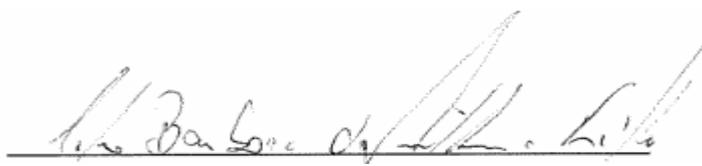
Aprovada em: 12 de março de 2020



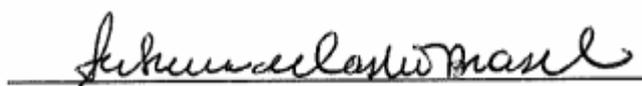
Orientador PhD. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira – INMETRO



Orientador PhD. Victor Talarico Leal Vieira - UNIGRANRIO



PhD Celso Barbosa Sant'anna Filho – INMETRO



PhD Sabrina Castro Brasil- UNIGRANRIO



PhD Mônica Aparecida Schultz Neves – UNESA

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo amor e cuidado, pela minha existência, pela minha família, por inserir pessoas incríveis em meu caminho, por ter permitido e sido o sustento para chegar até aqui! Gratidão, Senhor!

Aos meus pais, Nancy e Buttu, pelo amor, pelo apoio, incentivo e financiamento! Por terem acreditado em meus sonhos e na minha capacidade! Sempre foram local para pouso seguro! Amo muito vocês!

À minha filha, Laura e ao meu marido, Gabriel, pelo incentivo e força para esta caminhada, pela paciência em minha ausência, pelo carinho e a construção de uma vida de parceria! Amo muito vocês!

Aos professores, Leonardo e Victor, pela orientação deste trabalho, com tanta dedicação e paciência! Obrigada por terem colocado seu tempo e seu conhecimento à minha disposição. Obrigada por contribuírem para minha formação profissional e acadêmica de forma tão significativa! Gratidão por suas vidas!

À amiga Jacqueline, por sido a maior incentivadora desse sonho! Por me inspirar e encorajar a seguir em frente! Obrigada por tanta colaboração nessa trajetória! Gratidão por sua vida!

Ao professor Paulo Emílio e aos técnicos Priscila Grion e Douglas Santana, por toda assistência e atenção dispensada para execução dos ensaios experimentais. Gratidão!

Ao Biotrans, pela oportunidade de execução deste projeto, pelo excelente corpo docente que tanto contribuiu para meu desenvolvimento profissional e pessoal!

A todos os amigos, colegas de laboratório e familiares que torceram para o sucesso deste trabalho!

**MUITO OBRIGADA POR TUDO E POR TANTO!**

## RESUMO

Durante o tratamento de canal, os instrumentos de níquel-titânio (NiTi) podem fraturar e expor ao risco de insucesso do procedimento. Ainda não há relato na literatura que contemple os efeitos da liga de NiTi sobre as células residentes do ligamento periodontal em caso de extravasamento do fragmento para além do ápice. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e potencial pró-inflamatório das ligas de NiTi M-wire e memória controlada dos instrumentos ProDesign R (PDR), Reciproc R25 (RP), Reciproc Blue R25 (RPB) e WaveOne Gold Primary (WOG). Além das propriedades mecânicas que oferecem maior segurança de trabalho para o endodontista. A caracterização morfológica mostrou que houve diferença nos diâmetros e na conicidade dos instrumentos ( $p \leq 0,05$ ). A análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrou rebarbas na aresta lateral e marcas de usinagem ao longo eixo dos instrumentos. Os ensaios de Microdureza Vickers, Flexão em 45° e Flambagem e Fadiga demonstraram que os instrumentos PDR são os mais flexíveis e mais resistentes à fadiga cíclica ( $p \leq 0,05$ ). Os ensaios de Torção e Flambagem demonstraram que os instrumentos RP são mais rígidos ( $p \leq 0,05$ ). Os ensaios de MTT e LDH demonstraram diminuição na viabilidade celular, porém sem rompimento de membrana plasmática. A Análise de Múltiplos Mediadores demonstrou que os instrumentos PDR apresentam potencial citotóxico ( $p \leq 0,05$ ). Esses resultados indicam que os instrumentos RP são mais indicados para canais mineralizados e para retratamento. Os instrumentos PDR são mais indicados para canais curvos, porém, diante de sua fratura, recomenda-se a remoção dos fragmentos pelo seu potencial citotóxico e pró-inflamatório.

Palavras-chave: Instrumentos endodônticos; fraturas de instrumentos endodônticos; Nitinol; M-wire; Memória controlada; Citotoxicidade; Inflamação

## ABSTRACT

During root canal treatment, nickel-titanium (NiTi) instruments can fracture and expose to failure procedure risk. There is still no report in literature that contemplates NiTi alloy effects on cells residing in periodontal ligament in case of fragment leakage beyond apex. The aim of this study was to evaluate NiTi M-wire alloys and controlled memory cytotoxicity and pro-inflammatory potential using ProDesign R (PDR), Reciproc R25 (RP), Reciproc Blue R25 (RPB) and WaveOne Gold Primary (WOG) instruments. In addition the mechanical properties that offer greater job security to endodontist. Morphological characterization showed that there was a difference in diameters and taper of the instruments ( $p \leq 0.05$ ). An Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis applied burrs on lateral edge and machining marks along long axis of the instruments. Vickers Microhardness, Cantilever bending test, Buckling test and Cyclic fatigue test demonstrated that PDR instruments are the most flexible and most resistant to cyclic fatigue ( $p \leq 0.05$ ). Torsion testi and Buckling test demonstrated that RP instruments are more rigid ( $p \leq 0.05$ ). The MTT and LDH assays demonstrated a decrease in cell viability, but without rupture of plasma membrane. Multiplex analysis of secreted products demonstrated that PDR instruments have cytotoxic potential ( $p \leq 0.05$ ). These results indicate that RP instruments are more suitable for mineralized channels and for retreatment. PDR instruments are more suitable for curved channels, however, in view of their fracture, it is recommended to remove fragments due to their cytotoxic and pro-inflammatory potential.

**Keywords:** *Endodontic files; endodontic instrument fractures; Nitinol; M-wire; Control Memory; Cytotoxicity and Inflammation*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Instrumentos adotados no estudo.....	19
<b>Figura 2:</b> Fluxograma de ensaios.....	20
<b>Figura 3:</b> Aparato para ensaio de flexão em 45°.....	22
<b>Figura 4:</b> Esquema do ensaio de flambagem.....	23
<b>Figura 5:</b> Aparato para ensaio de flexão rotativa.....	23
<b>Figura 6:</b> Aparato para ensaio de torção.....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo do preparo dos extratos.....	26
<b>Figura 8</b> Esquema representativo do plaqueamento das células para o ensaio de citotoxicidade.....	26
<b>Figura 9</b> Ensaio de MTT (a) Esquema representativo do ensaio de MTT (b) Mapa da placa de MTT.....	27
<b>Figura 10</b> Esquema representativo do ensaio de LDH.....	28
<b>Figura 11</b> Microscopia óptica dos instrumentos estudados.....	29
<b>Figura 12:</b> Microscopia eletrônica de varredura da seção reta transversal dos instrumentos.....	31
<b>Figura 13:</b> Microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos instrumentos.....	32
<b>Figura 14:</b> Microscopia eletrônica de varredura da seção reta transversal da superfície de acabamento dos instrumentos.....	33
<b>Figura 15:</b> Efeitos do contato indireto com os instrumentos de NiTi na viabilidade celular de L929 por conversão de MTT em formazana.....	37
<b>Figura 16:</b> Efeitos do contato indireto com os instrumentos de NiTi na viabilidade celular de L929 por dosagem de LDH.....	38
<b>Figura 17:</b> Impacto do contato indireto com os instrumentos de NiTi na secreção de mediadores inflamatórios por THP-1.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Divisão dos instrumentos nos grupos de trabalho, quantidade utilizada e número de lote.....	19
<b>Tabela 2:</b> Valores médios de diâmetro para os diferentes instrumentos e respectivas conicidades.....	30
<b>Tabela 3:</b> Valores da microdureza Vickers dos instrumentos.....	34
<b>Tabela 4:</b> Valores de força determinados pelo ensaio de flexão em 45°.....	34
<b>Tabela 5:</b> Valores de força determinados pelo ensaio de flambagem.....	35
<b>Tabela 6:</b> Tempo para fratura dos instrumentos.....	35
<b>Tabela 7:</b> Torque e ângulo de rotação (°) dos instrumentos para fratura.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**°C:** Grau célsius

**ADA:** *American Dental Association*

**ANSI:** *American National Standards Institute*

**ATTC:** *American Type Culture Collection*

**bFGF:** Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos

**cm:** Centímetros

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**Ctrl-:** Controle negativo de morte celular

**Ctrl+:** Controle positivo de morte celular

**D:** Diâmetro

**D0:** Diâmetro nominal

**DMEM:** *Dulbecco`s Modified Eagle Medium*

**DP:** Desvio Padrão

**GCSF:** Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias

**g:** Grama

**gf:** Grama força

**GM-CSF:** Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

**IFN- $\gamma$ :** *Interferon gama*

**IL:** Interleucina

**IP-10:** Proteína Induzida por *Interferon gama 10*

**ISO:** *Internacional Organization for Standardization*

**KeV:** Quiloeletron-volt

**LDH:** Lactato Desidrogenase

**MCP-1:** Proteína Quimiotóxica de Monócitos 1

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**min:** Minuto

**MIP-1:** Proteína Inflamatória de Macrófago 1

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**$\mu$ L:** Microlitros

**MTT:** Reagente Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]]

**N:** Newton

**Nº:** Número

**Ncm:** Newton centímetro

**NiTi:** Níquel-titânio

**nm:** Nanômetros

**PDGF-BB:** Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas – BB

**PDR:** ProDesign R

**pg:** Picograma

**RANTES:** *Regulated on Activation, Normal T Expressed e Secreted*

**RP:** Reciproc

**RPB:** Reciproc Blue

**rpm:** Rotações por minuto

**s:** Segundo

**SFB:** Soro Fetal Bovino

**SNK:** Student-Newman-Kells

**TGF:** Fator de Transformação do Crescimento

**TNF $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

**VEGF:** Fator de Crescimento Endotelial Vascular

**vs:** *versus*

**WOG:** WaveOne Gold

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1.</b>	<b>Tratamento endodôntico</b> .....	13
<b>1.2.</b>	<b>As ligas de níquel-titânio (NiTi)</b> .....	13
<b>1.3</b>	<b>Novas tecnologias de fabricação das diferentes ligas de NiTi</b> .....	14
<b>1.4</b>	<b>Movimento recíprocante e evolução da cinemática</b> .....	15
<b>1.5</b>	<b>Citotoxicidade do níquel</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	18
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
<b>4.1</b>	<b>Instrumentos Endodônticos</b> .....	18
<b>4.2</b>	<b>Caracterização</b> .....	19
<b>4.2.1</b>	<b>Morfometria</b> .....	19
<b>4.2.2</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b> .....	20
<b>4.2.3</b>	<b>Microdureza Vickers</b> .....	20
<b>4.3</b>	<b>Ensaio mecânicos</b> .....	20
<b>4.3.1</b>	<b>Flexão em 45°</b> .....	20
<b>4.3.2</b>	<b>Flambagem</b> .....	21
<b>4.3.3</b>	<b>Fadiga</b> .....	21
<b>4.3.4</b>	<b>Torção</b> .....	21
<b>4.4</b>	<b>Ensaio biológicos</b> .....	21
<b>4.4.1</b>	<b>Cultura celular</b> .....	21
<b>4.4.2</b>	<b>Preparo dos extratos</b> .....	22
<b>4.4.3</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade</b> .....	25
<b>4.4.3.1</b>	<b>MTT</b> .....	26
<b>4.4.3.2</b>	<b>LDH</b> .....	26
<b>4.4.4</b>	<b>Análise de múltiplos mediadores secretados</b> .....	27
<b>4.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Tratamento endodôntico**

O tratamento endodôntico consiste na eliminação do tecido pulpar que sofreu danos devido ação microbiana ou traumas mecânicos, sendo realizada a limpeza e modelagem, proposta por Schilder, em 1974, e o posterior selamento do sistema de canais radiculares. Ele visa total desinfecção e conformação cônico-progressiva através do corte da dentina, permitindo seu selamento com materiais obturadores (Schilder, 1974).

As técnicas empregadas neste tratamento têm sofrido diferentes avanços nas últimas décadas. Instrumentos de aço inoxidável foram amplamente utilizados, permitindo um trabalho seguro em porções retas dos canais radiculares. Entretanto, por serem menos flexíveis, era comum ocorrer iatrogenias durante a instrumentação de canais curvos, como desvio na trajetória original do canal, perfurações radiculares, degrau apical e fratura do instrumento endodôntico. Diante disso, com o objetivo de vencer a complexidade anatômica dos canais radiculares e diminuir o risco de fratura e deformações causadas por limas de aço inoxidável, iniciou-se uma busca por novas ligas metálicas com maior flexibilidade e resistência para a confecção dos mesmos (Bergans *et al.*, 2003).

### **1.2 As ligas de níquel-titânio (NiTi)**

O desenvolvimento de uma nova liga metálica, de níquel-titânio (NiTi) passou a ser utilizado na fabricação de instrumentos endodônticos, mais resistente a fadiga e flexível, capaz de vencer as limitações mecânicas da liga de aço inoxidável (Berutti *et al.*, 2003). A primeira geração de instrumentos endodônticos confeccionados em ligas de NiTi foi composta de 56% de níquel e 44% de titânio e foi proposta por Walia *et al.*, em 1988. Por permitirem acionamento a motor esses instrumentos geram menor tempo de trabalho (Ferraz *et al.*, 2001).

Sua maior resistência à fratura por fadiga é devido às suas propriedades mecânicas de superelasticidade e memória de forma. O efeito memória de forma é a capacidade da liga metálica, após aquecida, retornar a sua forma original (Civjan *et al.*, 1975). O NiTi apresenta estrutura cristalina única (Cohen e Hargreaves,

2007). Por outro lado, a superelasticidade não depende de aquecimento, basta à aplicação de uma carga que a liga transforma de fase por tensão (microestrutura martensítica). Com a remoção da carga o objeto recupera sua forma inicial e a microestrutura retoma a fase matriz (austenita), mesmo quando realizadas altas deformações (Baumann, 2004).

### **1.3 Novas tecnologias de fabricação das diferentes ligas de NiTi**

Objetivando potencializar as propriedades mecânicas dos instrumentos endodônticos, alterações na liga de NiTi foram realizadas através de tratamentos térmicos. Isto modifica a estrutura cristalina da liga, favorecendo a propriedades de impacto clinicamente, reduzindo as chances de fratura. Gambarini et al (2011), comprovaram que a flexibilidade e a resistência à fadiga cíclica foram aumentadas nos instrumentos de NiTi quando realizado um tratamento térmico.

As ligas de NiTi com tratamento M-wire foram desenvolvidas, patenteadas e adotadas na fabricação de instrumentos como Reciproc (RP) (VDW, Monique, Alemanha). A liga é obtida por um processo termo-mecânico especial que faz com que uma fração de martensita fique aprisionada na microestrutura da liga. Isto é importante na melhoria dos resultados de flexibilidade e à fratura por fadiga (Johnson *et al.*, 2008; Kell *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2009; Al-Hadlaq *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Peixoto *et al.*, 2010).

Outro tratamento termo-mecânico empregado pela indústria é o de memória controlada. A liga submetida a este tratamento é finalizada contendo maior fração da fase martensita, gerando grande flexibilidade e ausência de memória elástica (superelasticidade), permitindo assim um melhor desempenho no preparo de canais radiculares com curvaturas acentuadas (Gambarani *et al.*, 2011; Elgnaghy, 2014).

Posteriormente, a empresa Dentsply Sirona introduziu instrumentos com tratamentos térmicos blue e gold, os quais são repetidamente tratados com altas temperaturas e posteriormente resfriados, resultando em uma cor de superfície de acordo com a espessura da camada do instrumento de óxido de titânio (Gavini *et al.*, 2018). Os tratamentos gold e blue não deixam de ser um tratamento de memória controlada, porém conferem para os instrumentos cores específicas externamente

e frações diferenciadas de martensita no interior do material, o que acaba por proporcionar propriedades mecânicas distintas.

Os três sistemas mais comercializados e utilizados no Brasil são confeccionados com ligas de memória controlada são WaveOne Gold (WOG) (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), Reciproc Blue (RPB) (VDW, Munique, Alemanha) e ProDesign R (PDR) (Easy, Belo Horizonte, Brasil).

#### **1.4 Movimento reciprocante e evolução da cinemática**

Os instrumentos de NiTi possuem superelasticidade, menor módulo de elasticidade, resistência a fadiga e à torção (Sereneet *et al.*, 1995), e por isso, passaram a ser acionados a motor, promovendo um preparo químico mais rápido, seguro e cônico progressivo (Walia *et al.*, 1988). A utilização da liga de NiTi proporcionou a inserção no mercado de instrumentos acionados por motor (Es-Souni *et al.*, 2005; Testarelli *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011).

A maior capacidade de corte dos instrumentos de NiTi associados ao movimento rotatório em 360° no sentido horário, permitiu o corte da dentina simultaneamente ao avanço do instrumento para o interior do canal radicular (Pedullà *et al.*, 2013). Entretanto, algumas desvantagens foram reportadas na literatura e na prática clínica sobre o movimento de rotação contínua: canais radiculares com alta complexidade, especialmente os curvos, ovais ou achatados, não eram devidamente instrumentados, principalmente na região apical, istmos, reentrâncias e ramificações (Sattapan *et al.*, 2000; Prichard, 2012). Contudo, a maior preocupação do endodontista era o elevado índice de fratura que ocorrera com tais instrumentos.

Uma nova técnica de instrumentação foi proposta por Yared, em 2008, utilizando o instrumento F2 do sistema ProTaper (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) acoplado a um motor que realizava movimento horário de avanço e anti-horário de alívio da ponta, assim, oscilando cinco vezes até completar 360°. Em seguida, foram lançados os instrumentos RP pela empresa VDW. O movimento reciprocante ocorre inicialmente no sentido anti-horário cortando a dentina, e o alívio no horário, evitando assim o efeito de “aparafusamento” dos instrumentos. Mais recentemente foram lançados os instrumentos também reciprocantes WOG e PDR. O movimento reciprocante aumenta a vida em fadiga dos instrumentos

(Lopes *et al.*, 2014), reduz a extrusão de debris (Silva *et al.*, 2014), reduz os defeitos dentinário de instrumentaçãodiminuindo a tendência de transporte do canal (Ahn *et al.*,2016; Adorno *et al.*, 2011).

### **1.5 Citotoxicidade do níquel**

Estudos demonstraram que o níquel está associado ao câncer (Denkhaus e Salnikov, 2002; Das *et al.*, 2008), causa danos a microrganismos e ao meio ambiente (Denkhaus e Salnikov, 2002; Das *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2011; Macomber e Hausinger, 2011). Também pode sensibilizar indivíduos causando dermatite de contato, uma hipersensibilidade tardia que se manifesta em um segundo contato do indivíduo exposto ao metal (Sosroseno, 1995, Kerosuo *et al.*, 1996).

Na odontologia, diversos materiais feitos de ligas metálicas contendo níquel permanecem em contato com os tecidos moles da cavidade bucal por tempo prolongado e nos canais radiculares durante a instrumentação endodôntica (Anusavice, 2005). No tratamento ortodôntico, os fios de NiTi, barquetes, bandas e outros dispositivos são expostos a saliva e alimentação diária favorecendo o processo de corrosão, liberando íons de níquel e outros componentes metálicos (Kim e Johnson, 1999, Kusy, 2000; Morais *et al.*, 2007; Bradao e Gontijo, 2012). Diversos estudos demonstraram manifestações bucais na presença de liberação de íons na cavidade bucal, como queilites, gengivites, hipertrofia gengival e estomatites que podem confundir o diagnóstico com hiperplasias gengivais e ulcerações bucais (Skoglund *et al.*, 1991; Rahilly, 2003; Pantuzo *et al.*, 2007; Pazzini *et al.*, 2010; Bradao e Gontijo, 2012). Além do efeito alergênico existe o carcinogênico, mutagênico e citotóxico desses íons (Jorge *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2008; Westphalen *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Embora os instrumentos de NiTi sejam mais seguros e mais eficientes no preparo do canal radicular quando comparados ao aço inoxidável, também estão suscetíveis à fratura. Seja fratura por fadiga à flexão rotativa que ocorre por ciclos de contração e tração do material no centro de curvatura do canal. Ou à fratura por

torção (Dias *et al.*, 2017), que ocorre quando a ponta do instrumento é imobilizado durante a instrumentação, enquanto a rotação continua (Correia de Sousa *et al.*, 2013).

O estudo das propriedades mecânicas é importante, pois gera informações que podem auxiliar o clínico na seleção de instrumentos endodônticos para diversas afinidades como por exemplo: tratamento de canal com acentuada curvatura, retratamento endodôntico e tratamento de canal atrésico. A seleção inadequada dos instrumentos para tais situações eleva o risco de fratura. Evitar a fratura é a melhor opção devido as possíveis complicações. Entretanto, caso ocorra, o entendimento do efeito da liga de NiTi no organismo é de suma importância para que seja tomada uma decisão dando continuidade ao tratamento.

Devido a sua flexibilidade, os instrumentos de NiTi tendem a fraturar na região apical do canal, sendo mais difíceis de removê-los (Morais e Stanley, 2014). Diante da fratura do instrumento, cabe ao endodontista avaliar a relação risco/benefício da remoção do fragmento. Em algumas situações que ocorre a fratura, a remoção do fragmento é realizada através da cirurgia parentodôntica (Bernabé e Holland, 2004), sendo um procedimento mais invasivo que o próprio tratamento de canal.

A não remoção do fragmento representa uma ação mais conservadora. Porém, ainda não há relato na literatura que contemple de forma integral os efeitos da liga de NiTi sobre as células do ligamento periodontal em caso de extrusão do fragmento para além do ápice. Os riscos de citotoxicidade pela corrosão desses metais quando os mesmos são mantidos no interior do canal em longo prazo, não são claros (Wefelmeier *et al.*, 2015).

A fim de auxiliar a tomada de decisão sobre o gerenciamento do fragmento no canal radicular, torna-se relevante o estudo dos fatores que levam à fratura destes instrumentos durante a utilização clínica, bem como as alterações sobre a viabilidade celular quando em contato com os fragmentos.

Os instrumentos precisam ser submetidos a ensaios mecânicos e de citotoxicidade, para que hajam evidências e a conduta clínica seja pautada nas mesmas. A investigação de que tipos de citocinas são induzidas por células em contato com o biomaterial pode prever a possibilidade ou não do desencadeamento de reações inflamatórias contra o mesmo sugerindo a remoção ou a manutenção do fragmento de um dado instrumento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as propriedades mecânicas e a citotoxicidade *in vitro* de instrumentos endodônticos de NiTi com quatro tipos de tratamento termomecânicos diferentes.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar se a geometria dos grupos de instrumentos estudados atende a norma da ANSI/ADA nº101;
- Determinar a microdureza Vickers das ligas M-wire e memória controlada;
- Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura o tipo de fratura dos instrumentos estudados;
- Comparar a flexibilidade entre os instrumentos estudados;
- Comparar o tempo em segundos para a fratura por fadiga entre os instrumentos estudados;
- Comparar a resistência à fratura por torção entre os instrumentos estudados;
- Investigar a possível toxicidade induzida pelos dois tipos diferentes de ligas de NiTi, seguindo os ensaios de MTT e LDH;
- Investigar alterações na secreção de mediadores inflamatórios após o cultivo com extrato produzidos com fragmentos dos diferentes instrumentos.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Instrumentos endodônticos**

O estudo adotou quatro instrumentos das diferentes ligas, que estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1** Instrumentos adotados no estudo (adaptada dos fornecedores)

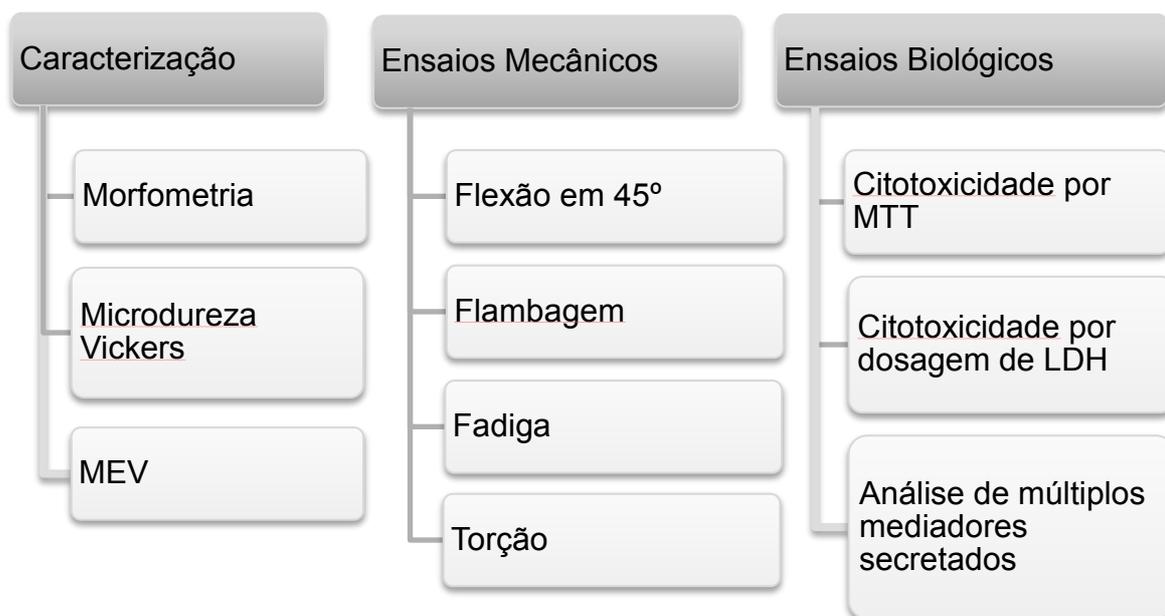
Os instrumentos foram divididos em quatro grupos RP (n=42), WOG (n=42), RPB (n=42) e PDR (n=42). Foram utilizados 168 instrumentos no total.

**Tabela 1** Divisão dos instrumentos nos grupos de trabalho, quantidade utilizada e número de lote

<b>Grupo</b>	<b>Tipo de liga do instrumento</b>	<b>Quantidade de instrumentos utilizada</b>	<b>Lote dos instrumentos</b>
<b>1 Reciproc</b>	M-wire	42	204657
<b>2 Reciproc Blue</b>	Memória controlada	42	246201
<b>3 WaveOne Gold</b>	Memória controlada	42	1450443
<b>4 ProDesign R</b>	Memória controlada	42	0028/0418

#### 4.2 Fluxograma de ensaios

O estudo foi dividido em ensaios de caracterização, mecânicos e biológicos. Conforme apresentado na Figura 2.



**Figura 2** Fluxograma de ensaios

A quantidade utilizada de cada instrumento para cada ensaio é a seguinte:

- Morfometria: 10 instrumentos de cada tipo e posteriormente utilizados em outros ensaios
- Microscopia Eletrônica de Varredura: 10 instrumentos de cada foram analisados após o ensaio de torção
- Microdureza Vickers: 2 instrumentos de cada tipo
- Flexão em 45°: 10 instrumentos de cada tipo
- Flambagem: 10 instrumentos de cada tipo
- Fadiga: 10 instrumentos de cada tipo
- Torção: 10 instrumentos de cada tipo
- Para os ensaios biológicos foram utilizados os mesmos instrumentos após ensaios mecânicos

## 4.3 Caracterização

### 4.3.1 Morfometria

Foram utilizados 10 instrumentos de cada tipo para este ensaio. A morfometria foi realizada em lupa binocular estereoscópica (Opticam, São Paulo, Brasil) as imagens foram observadas através do *software* (Ts-View; Opticam, São

Paulo, SP, Brasil), com escala ajustada em 0,51mm. Avaliou-se a base da ponta ( $D_0$ ), com aumento de 5x, e os diâmetros a três e seis mm da ponta, respectivamente ( $D_3$  e  $D_6$ ), sendo os dois últimos utilizados para o cálculo de conicidade (Equação 1), de acordo com o item 6.3.3.2 da norma ANSI/ADA nº 101, 2001.

$$\text{Conicidade} = \frac{D_6 - D_3}{3}$$

Equação 1. Conicidade, onde  $D_6$  é o diâmetro medido a seis mm da ponta e  $D_3$ , é o diâmetro medido a três mm da ponta

### **4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os instrumentos fraturados após o ensaio de torção foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV Quanta FEG FEI) (15 keV) para determinar o tipo de fratura e a presença de deformação plástica na haste helicoidal cônica.

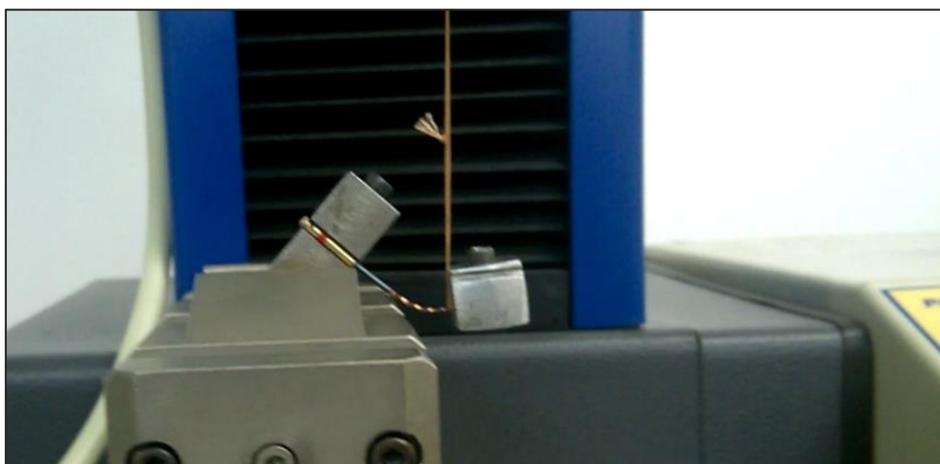
### **4.3.3 Microdureza Vickers**

Para determinar a Microdureza Vickers, dois instrumentos de cada tipo foram utilizados como recebidos. Foram utilizadas as partes intermediárias, próximas a  $D_5$ , visto que esta região é onde ocorre o ponto e fratura por fadiga. As amostras foram embutidas em baquelite em uma embutidora (Fortel - EFD 40, Casa Verde, São Paulo, Brasil). O lixamento foi realizado com uma lixadeira (Fortel - PLF, Casa Verde, São Paulo, Brasil) com lixas Norton (Norton, Penha, Rio de Janeiro, Brasil) de granulação 200, 400, 600 e 1200, e alumina de granulação 1  $\mu\text{m}$  (Fortel, Casa Verde, São Paulo, Brasil) para o polimento. Foi utilizado o microdurômetro Micromet 2003 Bueler (Waukegan Road, Lake Bluff, Illinois, EUA). As endentações foram feitas com 100gf durante 15 segundos, e avaliadas em aumento de 40x.

## **4.4 Ensaio mecânicos**

### **4.4.1 Flexão em 45°**

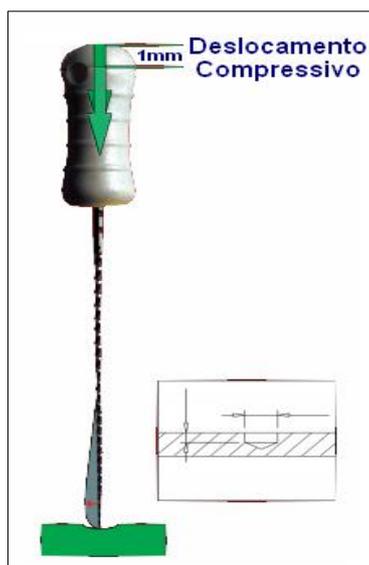
O ensaio de flexão em 45° foi realizado em 10 instrumentos de cada tipo utilizando uma máquina de ensaio universal (EMIC DL 200 MF; Instron, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Foi utilizada uma célula de carga de 20 N, seguindo a normativa nº 28 da ADA. Uma morsa de aço projetada para o ensaio foi usada para imobilizar os instrumentos a 3 mm da ponta, onde foi aplicada uma força de carga à uma velocidade de 15 mm/min. As hastes de fixação dos instrumentos foram mantidos à 45°, fixados em outra morsa (Figura 3). Os resultados foram analisados por *software* (Tesc; Instron, São José dos Pinhais, PR, Brasil), fornecendo a força máxima (gf) no ângulo de 45°.



**Figura 3** Aparato para ensaio de flexão em 45°

#### **4.4.2 Flambagem**

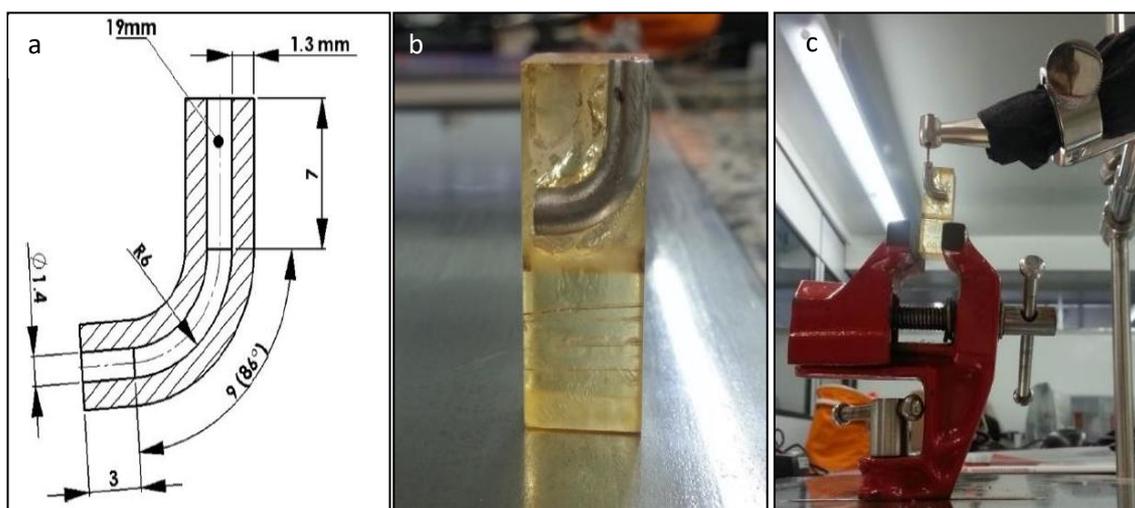
O ensaio de flambagem foi realizado em 10 instrumentos de cada tipo utilizando uma máquina de ensaio universal (EMIC DL 200 MF; São José dos Pinhais, PR, Brasil). Foi utilizada uma célula de carga de 20 N para registrar a força do descolamento compressivo de 1 mm, medindo-se a variação da deformação elástica com a carga aplicada. A velocidade do ensaio foi de 2 mm/min. A haste de fixação de cada instrumento foi fixada na cabeça da máquina de ensaio e a ponta do instrumento foi apoiada no fundo de uma placa de alumínio contendo uma cavidade com diâmetro de 1 mm e profundidade 0,5 mm, usinada com uma broca esférica (Figura 4).



**Figura 4** Esquema adaptado para o ensaio de flambagem (Elias *et al.*, 2008)

#### 4.4.3 Fadiga

Para o ensaio de fadiga foram utilizados 10 instrumentos de cada tipo, os quais foram posicionados em um canal simulado confeccionado em tubo de aço embutido em resina acrílica. Este canal foi fixado à uma morsa, de modo a permitir a inserção do instrumento instalado no motor em um eixo coincidente com a direção da parte reta do canal (Figura 5).

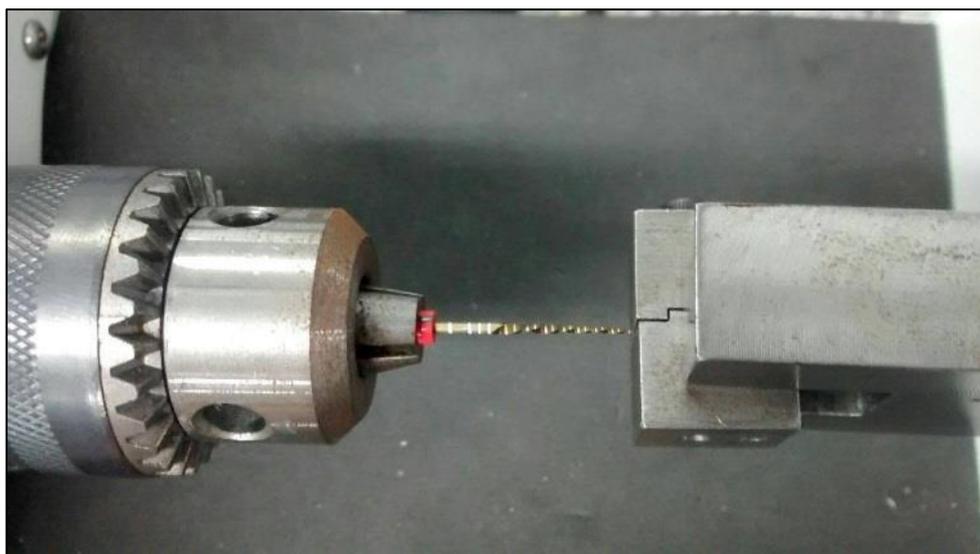


**Figura 5** Ensaio de fadiga (a) Imagem do dispositivo (Moreira, 2006); (b) Canal simulado utilizado no trabalho; (c) Representação do conjunto empregado no ensaio de fadiga

O centro de curvatura deste canal dista 4,75 mm da extremidade, portanto o ponto crítico para fratura do instrumento está aproximadamente a 5 mm da ponta, ou seja, próximo ao D5. O tempo da vida em fadiga dos instrumentos foi determinado como o tempo máximo em rotação para ocorrer a fratura e registrado por meio de um cronômetro. A velocidade do motor VDW Silver (Silver Reciproc; VDW, Monique, Alemanha) foi ajustada de acordo com os parâmetros fornecidos pelos fabricantes, utilizando o programa “Reciproc All”.

#### 4.4.4 Torção

Para o ensaio de torção foram utilizados 10 instrumentos de cada tipo. O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações da norma ISO 3630-1. Cada instrumento foi afixado a 3 mm da ponta usando uma morsa conectada a uma célula de carga sensível ao torque. O eixo do instrumento foi preso em um mandril acionado por um motor de passo (ODEME; Luzerna, SC, Brasil) (Figura 6). Todos os instrumentos foram girados no sentido anti-horário a uma velocidade de 2 rpm até a fratura. A carga de torque (Ncm) e a rotação angular ( $^{\circ}$ ) foram monitoradas continuamente usando um torquímetro (ODEME; Luzerna, SC, Brasil) e a força de torção e ângulo de rotação no momento da fratura foram fornecidos por um software (ODEME Analysis TT; ODEME).



**Figura 6** Aparato para ensaio de torção

## **4.5 Ensaio biológicos**

### **4.5.1 Cultura celular**

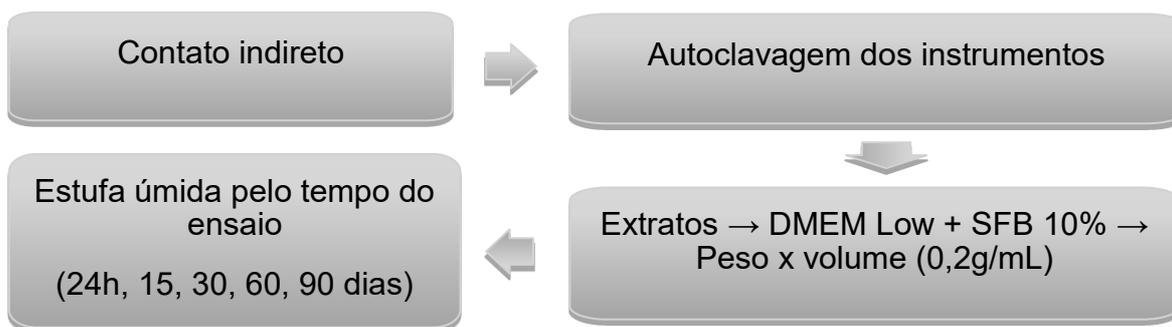
Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos utilizando fibroblastos de camundongos da linhagem L929. Para ensaios de secreção de mediadores inflamatórios, foram utilizadas células humanas THP-1, monócitos diferenciados em macrófagos. Cedido pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, RJ, Brasil), devidamente atestadas contra a presença de micoplasma (Kit de Detecção de Micoplasma Myco Alert-Lonza, Bazel, Suíça).

As células L929 foram mantidas em meio de cultura completo DMEM *Low* (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) suplementado com soro fetal de bovino (SFB) a 10% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com os laboratórios da ATCC. Estas culturas de células foram mantidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Corning Inc., Corning, NY, EUA) em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, mudando o meio a cada 2 dias.

As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com SFB a 10% e tratadas 1 µg/mL com PMA (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) por 24 horas. Após esse período foram ressuspensas em 2mL de meio de cultura a uma concentração de 5x10<sup>4</sup>, mantidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Corning Inc., Corning, Nova York, EUA) em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

### **4.5.2 Preparo dos extratos**

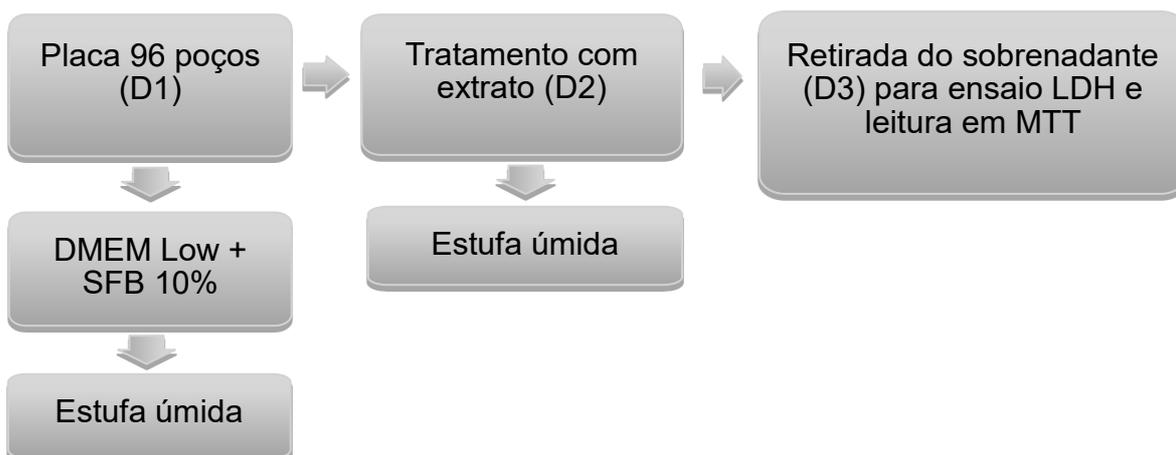
Para os ensaios de citotoxicidade, adotou-se o método de contato indireto, previsto na ISO 10993: 52009. Para isto, foram preparados os extratos, conforme a ISO 10.993: 12 2012, na qual 0,2 g de cada instrumento foram adicionados a 1 mL de meio de cultura DMEM *Low* suplementado com 10% de SFB. Os instrumentos foram cortados a uma determinada distância da base da ponta, até que atingissem a massa necessária para atender a relação massa vs volume descrita na norma (Figura 7). Também foram previamente autoclavados antes de serem adicionados ao meio de cultura. Os extratos permaneceram em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, pelo tempo necessário dos ensaios (24 horas, 15, 30, 60 e 90 dias).



**Figura 7** Esquema representativo do preparo dos extratos seguindo a norma ISSO 10993:12 2009

#### 4.5.3 Ensaio de Citotoxicidade

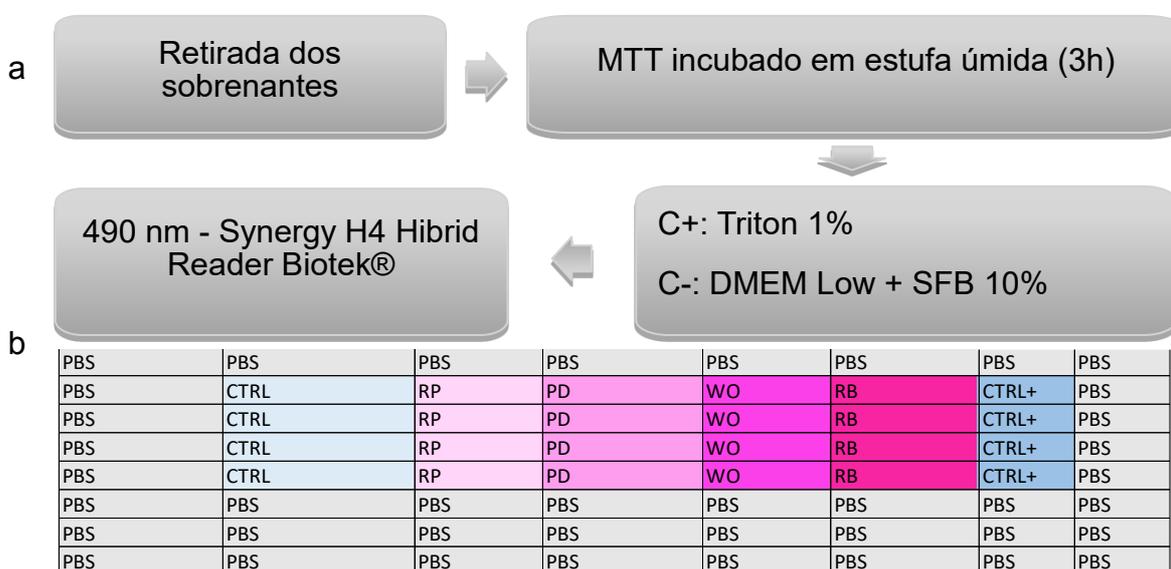
As células L929 foram contadas usando o método de exclusão azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) quantificado em câmara Newbauer. As células foram plaqueadas para experimentos a  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 96 poços usando uma pipeta e mantidas às condições de cultura de 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas (dia 1). Após esse período, as células foram tratadas com extratos e também mantidas às condições de cultura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> por mais 24 horas (dia 2). Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e as células foram usadas em procedimentos experimentais (dia 3), conforme representado na Figura 8.



**Figura 8** Esquema representativo do plaqueamento das células para o ensaio de citotoxicidade

#### 4.5.3.1 MTT

Após a exposição ao extrato, as células foram incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com 100 µL de meio completo contendo 1,5 g/mL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, Sigma Chem Co., Saint Louis, MO, EUA) foi adicionado. Após 3 horas, os sobrenadantes foram descartados, e foi adicionado aos poços 100 µL de DMSO. O controle positivo para morte celular foi realizado por incubação com 1% de Triton X-100 por 20 min. A absorbância, a fluorescência e a luminescência foram medidas em 24 horas, 15, 30, 60 e 90 dias utilizando espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA) a 490 nm (Figura 9).

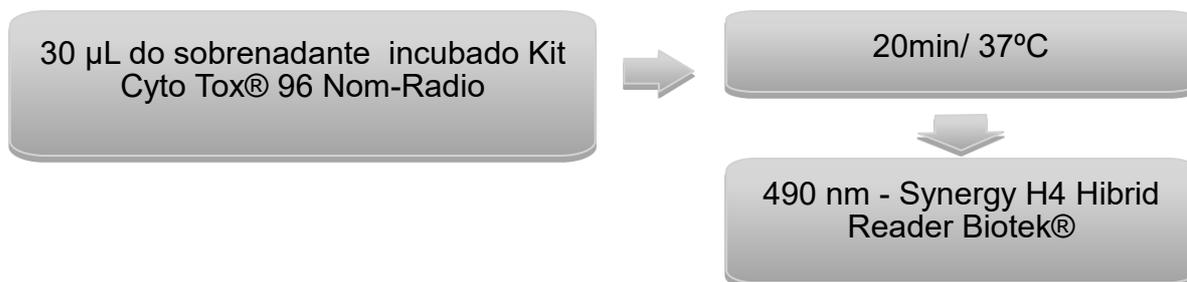


**Figura 9** Ensaio de MTT (a) Esquema representativo do ensaio de MTT (b) Mapa da placa de MTT

#### 4.5.3.2 LDH

A liberação de LDH (lactatodesidrogenase) foi determinada usando o kit colorimétrico CytoTox 96 Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, EUA). O controle positivo para morte celular foi realizado por incubação com 1% de Triton X-100 por 20 min. Após os tratamentos com extrato, 30 µL de sobrenadantes celulares foram transferidos para novas placas de 96 poços, seguidos pela adição de 30 µL de solução de substrato. Após 20 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, foram adicionados 30 µL de solução de parada a cada amostra. O desenvolvimento da cor foi proporcional ao número de células com

ruptura da membrana plasmática. A absorvância, a fluorescência e a luminescência foram medidas em 24 horas, 15, 30, 60 e 90 dias utilizando espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA) a 490 nm (Figura 10).



**Figura 10** Esquema representativo do ensaio de LDH

#### 4.5.4 Análise de múltiplos mediadores secretados

Após exposição com os extratos, para foi utilizado o kit multiplex de (Luminex Xmap, EUA) para determinar a secreção dos seguintes analitos: IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF). O procedimento experimental foi realizado como recomendado pelo fabricante e a leitura foi feita no equipamento Bio-Plex Magpix (LuminexXmap, Califórnia EUA). A concentração de cada produto secretado foi quantificada com o software (xPONENT versão 4.2, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Califórnia, EUA). Análise FACS (separador celular ativado por fluorescência) foi realizada no BD FACSDiva v8.0.

#### 4.6 Análise estatística

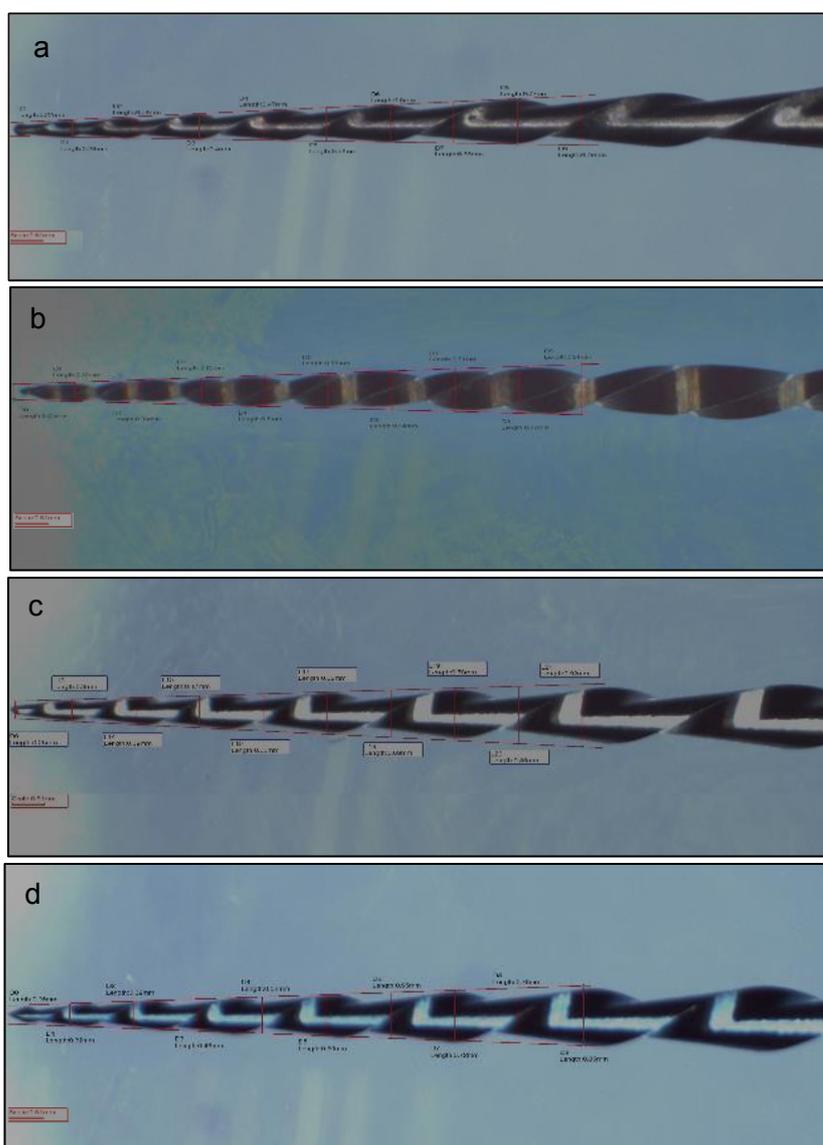
Para calcular a média e desvio padrão foi utilizado o GraphPad Prism 8 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para teste de normalidade foi usado o teste de Shapiro-Wilk em todos os grupos ensaiados. Quando constatada normalidade, adotou-se o teste de análise de variância (ANOVA). Todos os testes foram complementados com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Kells (SNK). Para todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização

#### 5.1.1 Morfometria

A Figura 11 mostra os diâmetros reais dos instrumentos obtidos a partir de retas tangentes às cristas superiores e inferiores da parte ativa dos mesmos, observados através da lupa binocular estereoscópica Opticam.



**Figura 11** Microscopia óptica dos instrumentos em escala de 0,51mm. (a) PDR; (b) WOG; (c) RP (d) RPB. Observou-se as medidas obtidas pelas retas tangentes (linhas vermelhas) às cristas superiores e inferiores da parte ativa dos mesmos

A dimensão  $D_0$  do instrumento é determinada pelo diâmetro da base da ponta e serve como referência durante a instrumentação do canal, pois o seu valor e a conicidade nominal do instrumento permitem determinar o diâmetro de trabalho em cada segmento do canal (Vieira *et al.*, 2011). Dez instrumentos de cada tipo foram igualmente mensurados para que se pudesse determinar a conicidade, e os dados podem ser observados na Tabela 2. Houve diferença estatisticamente significativa do diâmetro nominal entre os instrumentos PDR e os demais.

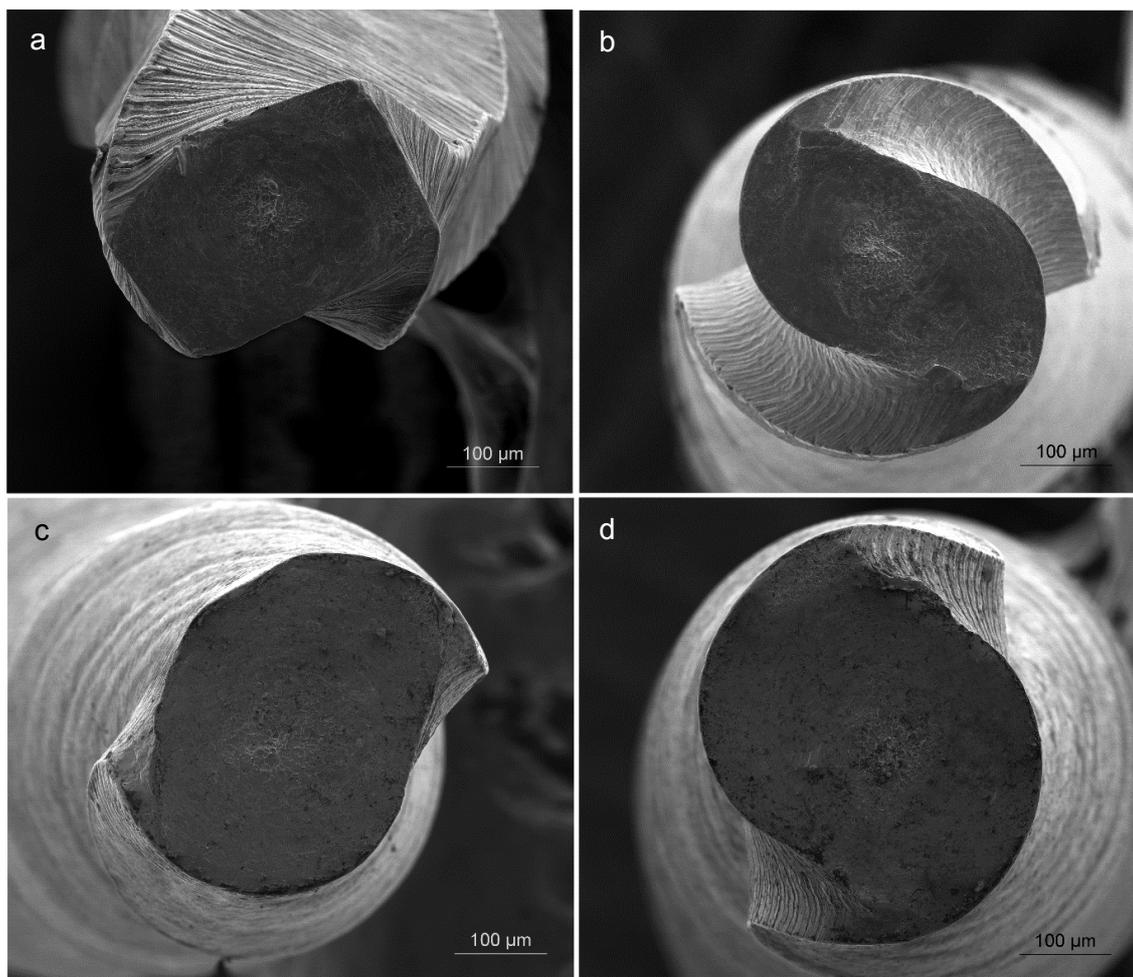
**Tabela 2** Valores médios de diferentes diâmetros dos instrumentos avaliados e suas respectivas conicidades

	<b>D0</b>	<b>D3</b>	<b>D6</b>	<b>CONICIDADE</b>
<b><i>Reciproc</i></b>				
<b>MÉDIA</b>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,06 ± 0,01
<b>CV</b>	0,07	0,02	0,02	0,09
<b><i>Reciproc Blue</i></b>				
<b>MÉDIA</b>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,06
<b>CV</b>	0,04	0,03	0,04	0,06
<b><i>WaveOne Gold</i></b>				
<b>MÉDIA</b>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,06
<b>CV</b>	0,07	0,03	0,03	0,07
<b><i>ProDesign</i></b>				
<b>MÉDIA</b>	0,25 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,43 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,06 ± 0,01
<b>CV</b>	0,06	0,04	0,07	0,02

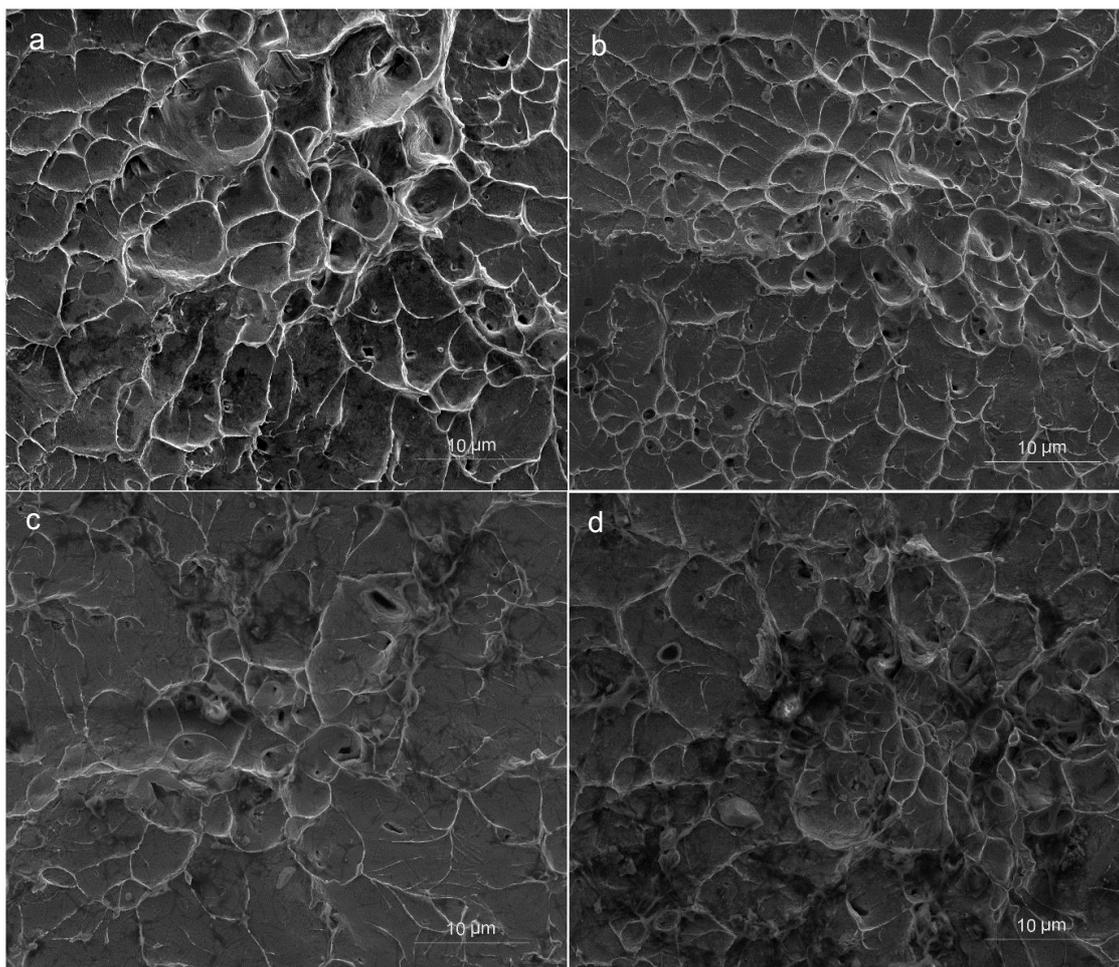
\*letras sobrescritas iguais indicam não que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

### 5.1.2 MEV

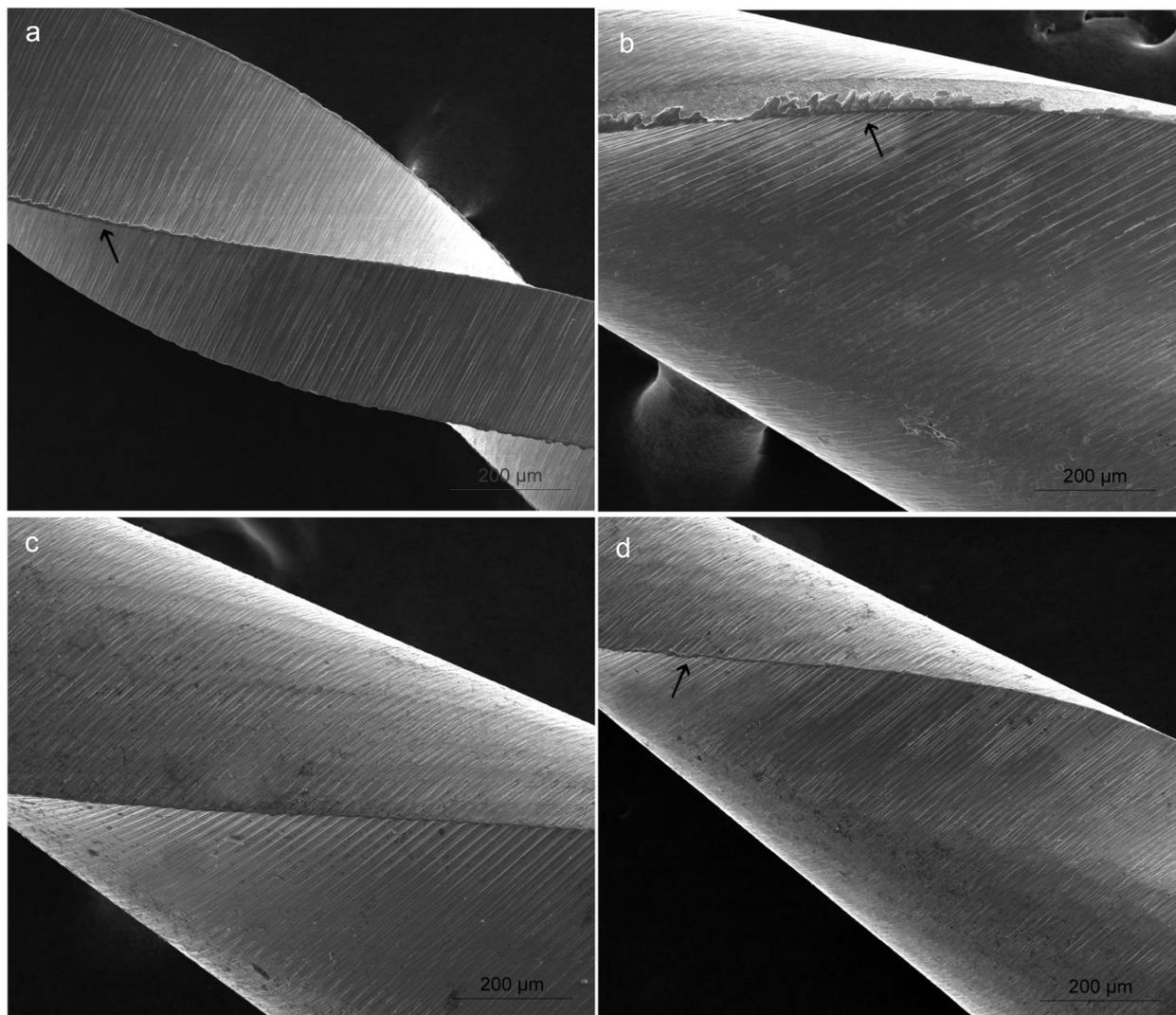
As Figuras 12 e 13 mostram a superfície de fratura por torção dos instrumentos em diferentes ampliações. A Figura 14 mostra a superfície de acabamento dos instrumentos.



**Figura 12** Seção reta transversal dos instrumentos fraturados por torção. Ampliação de 500x. (a) WOG; (b) PDR; (c) RP (d) RPB



**Figura 13** Superfície de fratura dos instrumentos após ensaio de torção. Ampliação de 1600x. (a) WOG; (b) PDR; (c) RP (d) RPB



**Figura 14** Superfície de acabamento dos instrumentos. Ampliação de 300x.(a) WOG; (b) PDR; (c) RP (d) RPB. Podem-se observar marcas de usinagem ao longo eixo do instrumento. Setas indicam rebarbas remanescentes na aresta lateral do instrumento devido ao acabamento inadequado

### 5.1.3 Microdureza Vickers

Os resultados foram registrados em força e podem ser observados na tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa da microdureza Vickers entre os instrumentos PDR e os demais.

**Tabela 3** Valores da microdureza Vickers dos instrumentos

<i>Instrumentos</i>	<i><math>\mu HV</math></i>
<b>Reciproc</b>	412 $\pm$ 22,06 <sup>a</sup>
<b>Reciproc Blue</b>	316 $\pm$ 36,15 <sup>a</sup>
<b>WaveOne Gold</b>	387 $\pm$ 14,95 <sup>a</sup>
<b>ProDesign R</b>	261 $\pm$ 9,19 <sup>b</sup>

\*letras sobrescritas iguais indicam não que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

Os resultados apresentaram a seguinte ordem, de maior para a menor microdureza: RP = RPB = WOG > PDR.

## 5.2 Ensaio mecânicos

### 5.2.1 Flexão em 45°

Os resultados foram registrados em força e podem ser observados na tabela 4. Houve diferença estatisticamente significativa da força empregada para flexão entre todos instrumentos.

**Tabela 4** Valores de força (gf) determinados pelo ensaio de flexão em 45°

<i>Instrumentos</i>	<i>Força (gf)</i>
<b>Reciproc</b>	329,9 $\pm$ 21,22 <sup>a</sup>
<b>Reciproc Blue</b>	213 $\pm$ 11,16 <sup>b</sup>
<b>WaveOne Gold</b>	391 $\pm$ 16,7 <sup>c</sup>
<b>ProDesign R</b>	220,2 $\pm$ 9,7 <sup>b</sup>

\*letras sobrescritas iguais indicam não que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

O ensaio demonstrou que os instrumentos apresentaram a seguinte ordem do mais flexível para o menos flexível: RPB = PDR > RP > WOG.

### 5.2.2 Flambagem

Os resultados foram registrados em força e podem ser observados na tabela 5. Houve diferença estatisticamente significativa da força empregada para flambagem entre todos instrumentos.

**Tabela 5** Valores da força no ensaio de flambagem

<i><b>Instrumentos</b></i>	<i><b>Força (gf)</b></i>
<b>Reciproc</b>	449,6 ± 33,43 <sup>a</sup>
<b>Reciproc Blue</b>	313,8 ± 41,17 <sup>b</sup>
<b>WaveOne Gold</b>	235,5 ± 8,37 <sup>c</sup>
<b>ProDesign R</b>	187,7 ± 15,56 <sup>d</sup>

\*letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

O ensaio demonstrou que os instrumentos apresentaram a seguinte ordem do menos ao mais resistente à flambagem: PDR > WOG > RPB > RP.

### 5.2.3 Fadiga

Os valores referentes ao tempo em segundos para fratura dos instrumentos diferentes instrumentos são mostrados na Tabela 6. Houve diferença estatisticamente significativa para o tempo de fratura entre todos instrumentos.

**Tabela 6** Tempo em segundos para fratura dos instrumentos

<i><b>Instrumentos</b></i>	<i><b>Tempo para fratura</b></i>
<b>Reciproc</b>	160,25 ± 18,48 <sup>a</sup>
<b>Reciproc Blue</b>	237 ± 34,12 <sup>b</sup>
<b>WaveOne Gold</b>	68,8 ± 8,29 <sup>c</sup>
<b>ProDesign R</b>	770,17 ± 148,05 <sup>d</sup>

\*letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

Os resultados apresentaram a seguinte ordem, do maior para o menor tempo para fratura: PDR > RPB > RP > WOG.

#### 5.2.4 Torção

Os valores referentes ao torque e ângulo de rotação para a fratura dos diferentes instrumentos são mostrados na Tabela 7. Houve diferença estatisticamente significativa do ângulo de rotação entre os instrumentos RP e os demais instrumentos e houve diferença estatisticamente significativa do torque entre os instrumentos RP, PDR e os demais.

**Tabela 7** Torque e ângulo de rotação (°) dos instrumentos para fratura

<i>Instrumentos</i>	<i>Ângulo</i>	<i>Torque</i>
<b>Reciproc</b>	348,2 ± 174,9 <sup>a</sup>	0,019 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b>Reciproc Blue</b>	503,5 ± 47,01 <sup>b</sup>	0,018 ± 0,004 <sup>b</sup>
<b>WaveOne Gold</b>	489,2 ± 51,26 <sup>b</sup>	0,014 ± 0,009 <sup>b</sup>
<b>ProDesign R</b>	565,2 ± 67,35 <sup>b</sup>	0,010 ± 0,002 <sup>c</sup>

\*letras sobrescritas iguais indicam não que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

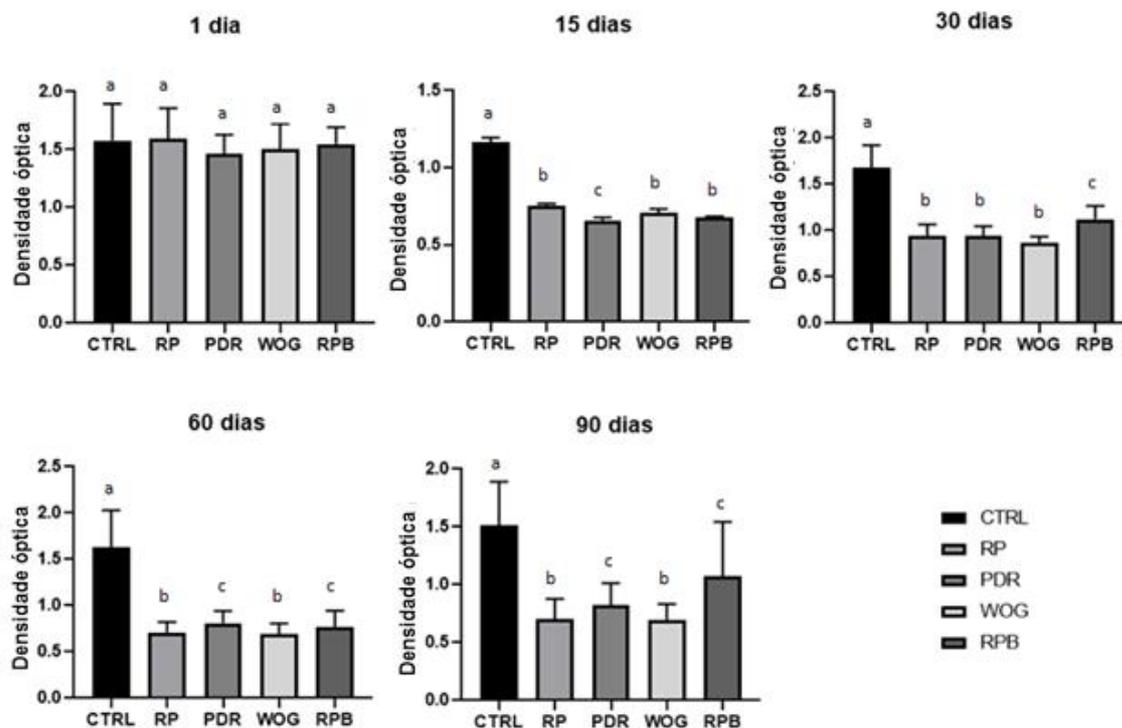
Os resultados demonstraram a seguinte ordem, de valor máximo de força: RP > RPB = WOG > PDR.

### 5.3 Ensaio biológicos

#### 5.3.1 MTT

A viabilidade celular está proporcionalmente relacionada ao grau de redução do MTT em formazana realizado por enzimas mitocondriais viáveis e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância (Mosmann, 1983). a viabilidade das células L929 foi estudada avaliando a densidade óptica das placas onde continham células

viáveis. Os testes foram realizados com a incubação de 24 horas das células com extratos de 1, 15, 30, 60 e 90 dias. A Figura 15 mostra os valores de densidade óptica obtidos após os respectivos tempos de incubação das células com extratos dos diferentes instrumentos.

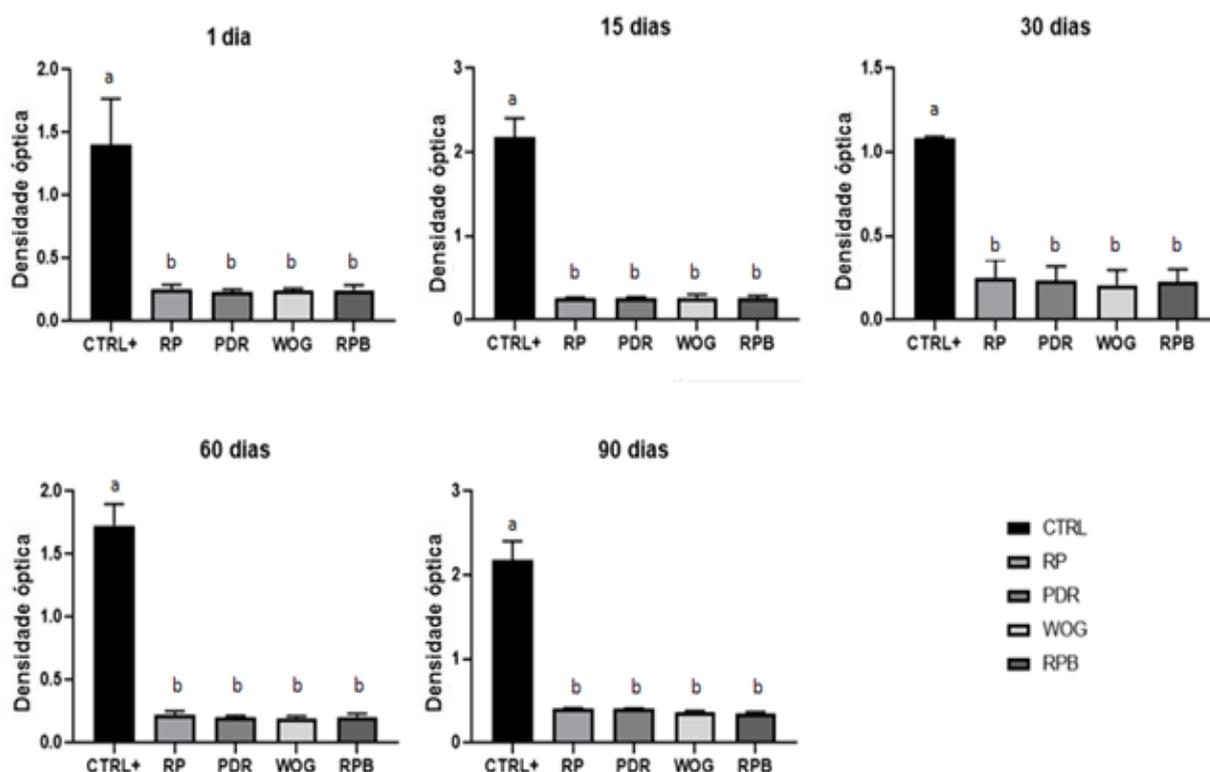


**Figura 15** Efeitos do contato indireto com os instrumentos de NiTi na viabilidade celular de L929 por conversão de MTT em formazana. Densidade óptica das placas após incubação com extratos dos instrumentos RP, PDR, WOG, RPB em 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Teste one-way ANOVA com múltiplas comparações do teste de SNK em comparação ao respectivo grupo controle (letras diferentes sobrescritas indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o controle  $p < 0,05$ , letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa)

Em 24 horas não houve redução do MTT em formazana dos grupos em comparação ao controle. Em 15 dias foi possível observar redução na concentração de MTT em todos os grupos, sendo PDR o que mais reduziu a viabilidade celular. Em 30 dias também houve redução na concentração de MTT em todos os grupos, sendo RPB o que menos reduziu a viabilidade celular. Em 60 e 90 dias também houve redução na concentração de MTT em todos os grupos, sendo RP e WOG os que mais reduziram a viabilidade celular.

### 5.3.2 Liberação de LDH

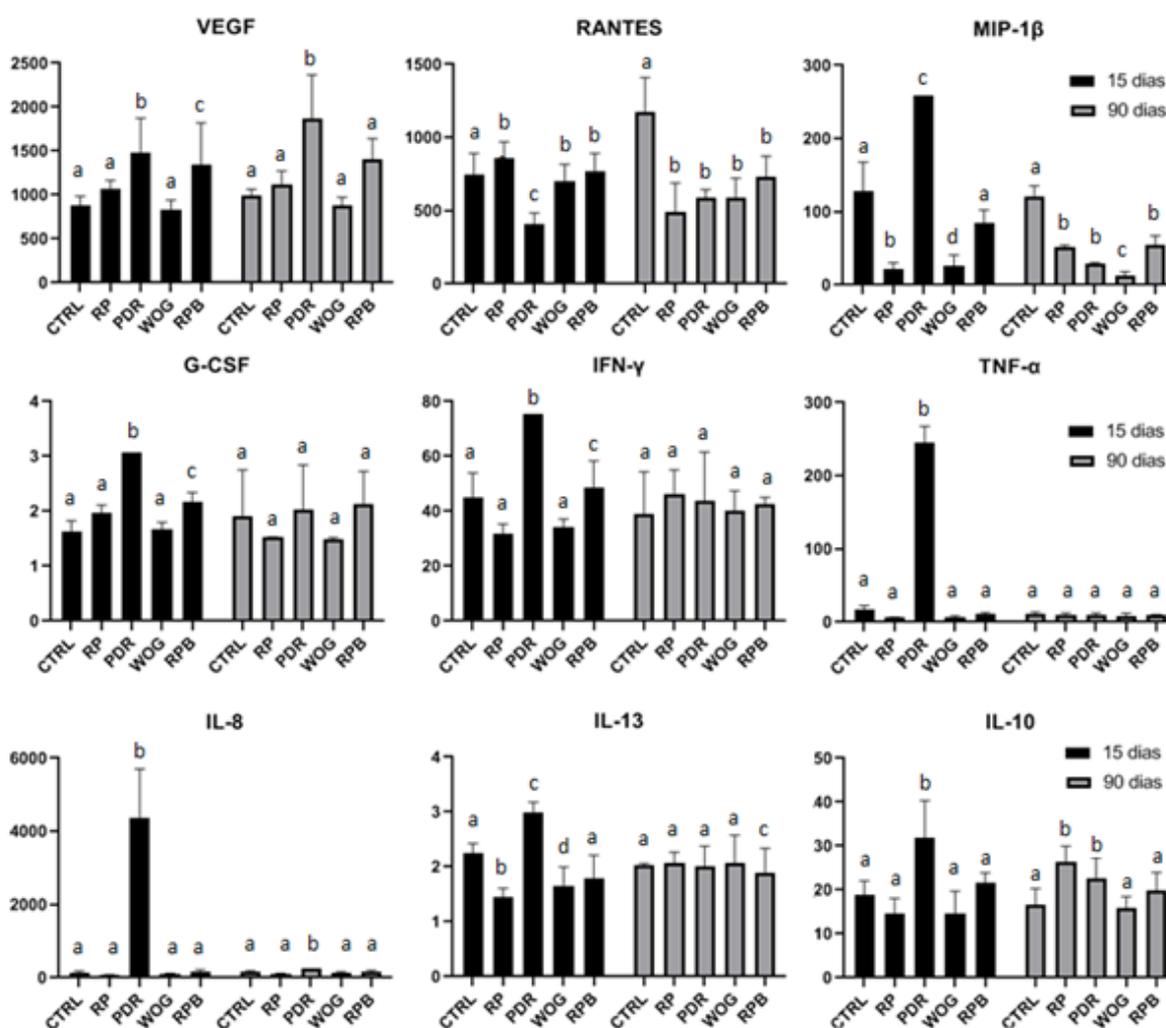
A enzima lactato desidrogenase (LDH) é um marcador de integridade de membrana, sua concentração é inversamente correlacionada com a viabilidade celular. Esta enzima está presente em todo o citoplasma celular, e quando a membrana é danificada há liberação no meio externo, neste caso, o sobrenadante. A viabilidade das células L929 também foi estudada avaliando a atividade de LDH no sobrenadante das culturas. Os testes foram realizados com a incubação de 24 horas das células com extratos de 1, 15, 30, 60 e 90 dias. A Figura 16 mostra os valores de densidade óptica obtidos após os respectivos tempos de incubação das células com extratos dos diferentes instrumentos. Não houve atividade significativa de LDH de todos os grupos em comparação ao controle, em todos os tempos.



**Figura 16** Efeitos do contato indireto com os instrumentos de NiTi na viabilidade celular de L929 por dosagem de LDH. Densidade óptica das placas após incubação com extratos dos instrumentos RP, PDR, WOG, RPB em 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Teste one-way ANOVA com múltiplas comparações do teste de SNK em comparação ao respectivo grupo controle (letras diferentes sobrescritas indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o controle  $p < 0,05$ , letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa)

### 5.3.3 Análise de múltiplos mediadores inflamatórios

A liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento incluindo: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), RANTES (Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada), MIP-1 $\alpha/\beta$  (proteína inflamatória de macrófago), G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), IFN- $\gamma$  (interferon gama), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e interleucinas 8, 10 e 13 (IL-8, IL-10, IL-13) estão apresentadas na Figura 17.



**Figura 17** Impacto do contato indireto com os instrumentos de NiTi na secreção de mediadores inflamatórios por THP-1. Concentração da secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento após incubação com extratos dos instrumentos RP, PDR, WOG, RPB em 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Teste one-way ANOVA com múltiplas comparações do teste de SNK em comparação ao respectivo grupo controle (letras diferentes sobrescritas indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o controle  $p < 0,05$ , letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa)

A análise de múltiplos mediadores secretados das células THP-1 após tratamento com os extratos, em 15 e 90 dias, comparadas ao controle, mostrou:

- VEGF: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 dias e em 90 dias. Também foi aumentada em contato com extratos de RPB em 15 dias.
- RANTES: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de RP, WOG e RPB em 15 dias e foi menor em contato com extratos de PDR em 15 dias. Em 90 dias, não houve aumento de sua expressão.
- MIP-1 $\beta$ : Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 dias e foi menor em contato com extratos de RP e WOG em 15 dias. Em 90 dias, não houve aumento de sua expressão.
- G-CSF: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR e RPB em 15 dias. Em 90 dias, não houve aumento de sua expressão.
- IFN- $\gamma$ : Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR e RPB em 15 dias. Em 90 dias, não houve aumento de sua expressão.
- TNF- $\alpha$ : Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 dias. Em 90 dias, não houve aumento de sua expressão.
- IL-8: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 e 90 dias.
- IL-13: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 dias e foi menor em contato com extratos de RP e WOG em 15 dias e RPB em 90 dias.
- IL-10: Sua expressão foi aumentada em contato com os extratos de PDR em 15 dias e 90 dias. Também foi aumentada em contato com extratos de RP em 90 dias.

## 6. DISCUSSÃO

Através da morfometria foram obtidas informações sobre a precisão dimensional dos instrumentos que puderam ser confrontadas com as especificações nominais de fabricação. Os instrumentos atenderam a recomendação da norma ANSI/ADA nº101, 2001. Somente os instrumentos PDR apresentaram precisão de fabricação do diâmetro da base da ponta (D0) com 0,25

mm de acordo com a especificação nominal. O único instrumento que apresentou conicidade de acordo com a nominal foi o PDR (0,06). Os demais apresentaram conicidade abaixo da esperada: RP e RPB (0,08) e WOG (0,07). Estes valores juntamente com o tipo de tratamento térmico da liga de NiTi, possuem influência nas suas propriedades mecânicas de flexão, flambagem, torção e fadiga. O único ensaio que não é afetado pela geometria do instrumento é o de microdureza.

Os instrumentos PDR apresentam menor microdureza, indicando maior flexibilidade.

Em relação ao modo de fratura, os instrumentos apresentaram fratura característica do tipo dúctil compatível com diversos trabalhos encontrados na literatura (Figura 13) (Moreira, 2006; Lopes *et al.*, 2010; Lopes *et al.* 2011). Foi possível observar a presença de deformação plástica nas arestas dos instrumentos WOG, PDR e RPB (Figuras 14a, 14b e 14d) e somente o instrumento RP apresenta fio de corte adequado com aresta evidente para o trabalho clínico (Figura 14c). Este estudo não visou estudar a capacidade de corte, porém esta evidência leva a crer que este instrumento poderia apresentar melhor desempenho de corte. A presença de deformação plástica nos instrumentos de liga de memória controlada ocorreu, pois estes instrumentos não são superelásticos e permitem deformação, diferente da liga M-wire predominantemente austenítica.

A presença de rebarbas encontrada nos instrumentos PDR pode influenciar no preparo mecânico e proporcionar desprendimento de material do corpo do instrumento durante a instrumentação. Mesmo que o instrumento não seja fraturado no interior do canal, remanescentes metálicos podem ficar residentes juntamente com debris de instrumentação. A existência das rebarbas pode ser atribuída ao processo de usinagem no momento da fabricação e ao acabamento superficial proporcionado pelo fabricante. Outro fato importante é que estes defeitos podem reduzir a capacidade de corte dos instrumentos, contribuindo para que o operador aumente carregamento no sentido apical a fim de atingir o limite de instrumentação desejado. Isto aumenta o risco de fratura, seja ela por torção ou por fadiga, pois induz maiores níveis de tensão no instrumento.

A flexibilidade de um instrumento pode ser definida como a deformação elástica sofrida quando é aplicada uma força perpendicular na sua extremidade (Serene *et al.*, 1995). Ela está associada à composição química, ao tratamento termomecânico, comprimento, geometria e secção transversal (Al-Hadlaq *et al.*,

2010; Gao *et al.*, 2010; Tripi *et al.*, 2006; Turpin *et al.*, 2000). Os instrumentos com tratamento térmico blue e gold apresentam maior fração de martensita na sua composição e possuem menor módulo de elasticidade (Thompson, 2000), proporcionando menor rigidez estrutural. Devido à secção reta transversal quadrangular, o instrumento WOG mostrou menor flexibilidade (Figura 12a).

A flexibilidade apresenta relação inversa tanto com a conicidade quanto com o diâmetro nominal (D0). Todos os instrumentos apresentaram mesma conicidade medida, portanto, os fatores que influenciaram foram a secção reta transversal e o diâmetro em D0. Os instrumentos de maior D0 (RP e WOG) apresentaram menor flexibilidade.

Em geral, quanto maior a flexibilidade do instrumento, menor será a possibilidade de ocorrência de desvio apical durante o tratamento do sistema de canais radiculares (Elias e Lopes, 2007). Além de influenciar a capacidade do instrumento em modelar adequadamente canais curvos. Alguns estudos mostram que instrumentos mais flexíveis produzem preparos mais centralizados (Esposito e Cunningham, 1995; Short *et al.*, 1997; Gergi *et al.*, 2010).

Flambagem é a deformação elástica apresentada por um instrumento endodôntico quando submetido a uma força compressiva na direção de seu eixo (axial) (Elias e Lopes 2007). Assim, o instrumento empregado no tratamento endodôntico deve resistir ao encurvamento elástico, ou seja, deve apresentar resistência a flexocompressão (flambagem). Quanto mais rígido o instrumento endodôntico, maior é a força empregada, ou seja, mais resistente à flambagem. Os instrumentos RP apresentaram maior D0, ou seja, maior área para resistir à flambagem e menor flexibilidade. A menor resistência à flambagem dos instrumentos PDR se deve ao menor módulo de elasticidade da liga, o quociente entre a tensão de tração aplicada a um corpo e a deformação elástica que ela provoca (Serene *et al.*, 1995; Lopes e Siqueira Júnior, 2004; Elias e Lopes, 2007). Os instrumentos que apresentaram melhores propriedades de flambagem foram os RP, portanto eles são indicados para utilização em canais atrésicos e de retratamento.

Os instrumentos do PDR apresentaram uma vida de fadiga maior que os demais, pela sua alta flexibilidade e menor diâmetro da ponta, corroborando com resultados já encontrados na literatura (Silva *et al.*, 2018). Quanto maior a flexibilidade, menores são os níveis de tensão no interior do canal simulado, o que

terá consequências na nucleação e propagação das trincas. Os instrumentos RPB apresentaram maior vida de fadiga quando comparados aos instrumentos WOG e RP, corroborando com outro estudo (Keskin *et al.*, 2017). A secção reta transversal quadrangular do WOG (Figura 9a) possui maior área do a do RPB e sabe-se que instrumentos com maior massa metálica no núcleo apresentaram resistência à fadiga cíclica reduzida (De-Deus *et al.*, 2014). A vida em fadiga é o quanto o instrumento endodôntico é capaz de resistir à fratura em uma determinada condição tensão (Tobushi *et al.*, 1998). Estudos mostram que a flexão rotativa é o principal motivo de fratura dos instrumentos endodônticos, correspondendo até 90% das falhas mecânicas que ocorrem na prática clínica (Parashos *et al.*, 2014).

Os instrumentos RP são mais resistentes à fratura por torção do que outros instrumentos testados e requerem maior torque para à fratura. O torque pode ser definido como o efeito rotatório criado por uma força distante do eixo de rotação de um objeto (Let *et al.*, 2011). Isso pode implicar em uma menor chance de ruptura, em uma situação clínica, quando a ponta do instrumento fica imobilizada no canal radicular e o instrumento continua a ser acionado. Além da maior resistência a flambagem, estes instrumentos estariam indicados em casos de canais mineralizados e desobstrução para retratamento também por este motivo. Outro achado do ensaio de torção é que RP apresentou rotação angular significativamente menor quando comparada aos outros instrumentos, isso se deve ao fato que a liga M-wire é menos flexível que a liga de memória controlada. A maior deflexão angular dos instrumentos com memória controlada pode servir como fator de segurança durante o preparo químico-mecânico pois a deformação plástica indica visualmente a fratura iminente.

Materiais citotóxicos normalmente comprometem a integridade da membrana celular e estruturas celulares como as mitocôndrias, induzindo a morte por apoptose ou necrose (Mosmann, 1983). Em 24 horas de contato com os extratos, como preconiza a norma ISO 10993:5 2009, não houve redução significativa da viabilidade celular quando comparados ao controle. Já em 15, 30, 60 e 90 dias houve redução significativa da viabilidade celular avaliada pela atividade mitocondrial, em comparação ao controle. Entretanto, em nenhum dos tempos houve redução significativa da viabilidade celular em comparação ao controle, avaliando a integridade da membrana, o que sugere uma possível morte celular por apoptose.

A presença de um biomaterial no ambiente *in vivo* contribui para uma superestimulação a longo prazo do sistema imunológico, o que leva a inflamação crônica e má cicatrização de feridas. Essa reação desequilibrada é conhecida como reação de corpo estranho (Anderson *et al.*, 2007), que pode ser dividida em quatro etapas principais: (1) adsorção de proteínas do plasma sanguíneo no corpo estranho; (2) recrutamento de monócitos e diferenciação para macrófagos; (3) ativação e fusão de macrófagos para formar células gigantes; (4) recrutamento e ativação de fibroblastos para formar tecido fibrótico. Independentemente do tecido em que se encontra o biomaterial, a resposta inflamatória inicial é ativada por lesão no tecido conjuntivo vascularizado (Mariani *et al.*, 2019).

Alguns segundos após a lesão, o sangue dos vasos danificados envolve o biomaterial, iniciando assim a interação com este. Em questão de minutos, os componentes plasmáticos do hospedeiro, são rápida e espontaneamente adsorvidos na superfície do implante (Tang e Eaton, 1993; Wilson *et al.*, 2011), desenvolvendo de uma matriz provisória transitória que se forma no biomaterial e ao redor dele. A presença de mitógenos, quimioatraentes, citocinas, fatores de crescimento e outros agentes bioativos na matriz provisória fornece um meio rico de substâncias ativadoras e inibidoras capazes de atrair monócitos circulantes, que passam a expressar fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e promovem a angiogênese (Mariani *et al.*, 2019). Os monócitos então são ativados e diferenciados em macrófagos (Anderson *et al.*, 2007). Os macrófagos ativados são capazes de secretar uma ampla gama de citocinas e quimiocinas, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 (interleucinas), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), IFN- $\gamma$  (interferon gama), G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento), MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), MIP-1  $\alpha/\beta$  (proteína inflamatória de macrófago), RANTES (Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada) (Fujiwara e Kobayashi, 2005; Measure *et al.*, 2010). Os macrófagos aderentes à superfície do biomaterial se fundem para formar células gigantes de corpo estranho (FBGCs), na tentativa de fagocitar o biomaterial (Anderson *et al.*, 2007). A secreção subsequente de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, direciona a resposta inflamatória e cicatrizante ao biomaterial.

A expressão de VEGF foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos PDR e RPB em 15 dias e em contato com PDR em 90 dias, indicando

inflamação e cicatrização, respectivamente. MIP-1 $\beta$  e RANTES são quimiocinas responsáveis por atrair monócitos/macrófagos. Sua expressão em 15 dias foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos PDR e significativamente aumentada em contato com todos os instrumentos, exceto PDR, respectivamente. Já em 90 dias não houve expressão significativa destas quimiocinas. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 e G-CSF são proteínas responsáveis por mais recrutamento e ativação de mais macrófagos. A expressão de todas essas proteínas foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos PDR em 15 dias e a expressão de G-CSF também foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos RPB em 15 dias. IL-13 é responsável por regular positivamente a fusão de macrófagos e sua expressão em 15 dias foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos PDR. IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória e sua expressão foi significativamente aumentada em contato com os instrumentos PDR, em 15 dias e significativamente aumentada em contato com os instrumentos RP em 90 dias. Esses achados indicam que houve processo inflamatório crônico induzido pelos instrumentos PDR e tentativa de cicatrização de ferida.

## **7. CONCLUSÃO**

Os instrumentos atenderam a recomendação da norma ANSI/ADA nº101, 2001 apresentando diâmetros e conicidades adequadas. A microscopia eletrônica de varredura revelou que os instrumentos possuem bom acabamento em geral, exceto pela presença de rebarbas de usinagem nos instrumentos PDR. Os ensaios de microdureza Vickers, flambagem e flexão em 45° revelaram que os instrumentos PDR são os mais flexíveis, e conseqüentemente menos propensos à fratura por flexão rotativa, sendo adequados para instrumentação de canais curvos. Os instrumentos RP necessitam de maior torque para fraturar sob torção e apresentaram maior resistência a flambagem, o que os torna adequados para instrumentação de canais mineralizados e para retratamentos. Os instrumentos de memória controlada (RB, WOG e PDR) apresentam maior deflexão angular, o que permite descarte do instrumento mediante a uma deformação plástica severa durante o uso evitando a fratura.

A análise da viabilidade celular através do método de contato indireto revelou potencial nocivo à fibroblastos da linhagem L929, a partir de 15 dias de estudo, entretanto, o tipo de morte sugerido seria por apoptose. Para confirmar resultados através do ensaio de LDH, o tempo de incubação das células com os extratos poderia ser mais de 24 horas, como foi realizado. Sugere-se repetição dos ensaios com tempo de 48 e 72 horas de incubação.

Na análise mediadores secretados, os resultados demonstraram que o instrumento PDR induz resposta inflamatória em 15 dias, em comparação aos controles nos tempos específicos, tendo elevada secreção dos fatores tróficos analisados. Os resultados indicam que houve processo inflamatório crônico e tentativa de cicatrização de ferida.

Dessa forma, identificou-se que os instrumentos RP são os mais adequados para instrumentação de canais mineralizados e para retratamentos. Os instrumentos PDR por apresentarem maior flexibilidade são mais adequados para instrumentação de canais curvos. Caso haja fratura destes instrumentos no interior do canal, eles apresentarão citotoxicidade e indução de inflamação, portanto, podendo auxiliar na tomada de decisão do profissional endodontista diante da sua fratura, e melhorar o nível de segurança do paciente, evidencia-se a necessidade da remoção do seu fragmento do interior do canal.

## 8 REFERÊNCIAS

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Specification no 28. **Root canal files and reamers, type K for hand use**. American Dental Association Council on Scientific Affairs, 1998.

ANDERSON, J.M; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology Journal**, v. 20, n.2, p. 86–100, 2008.

ADORNO, C.G.; YOSHIOKA, T.; SUDA, H. Crack initiation on the apical root surface caused by three different nickel-titanium rotary files at different working lengths. **Journal of Endodontic**, v. 37, p. 522–5, 2011.

AHN, S.; KIM, H.; KIM, E. Kinematic effects of nickel-titanium instruments with reciprocating or continuous rotation motion: A systematic review of in vitro studies. **Journal of Endodontic**, v. 42, p.1009–1017, 2016

AL-HADLAQ, S. M.; ALJARBOU, F. A.; ALTHUMAIRY, R. I. Evaluation of cyclic flexural fatigue of M-wire nickel-titanium rotary instruments., **Journal of Endodontic** v. 36, p. 305-307, 2010.

ANSI/ADA. **Root Canal Instruments**: General requirements. American Dental Association Council on Scientific Affairs, 2001.

ANUSAVICE, K.J **Phillips, Materiais Dentários**,11a ed; 2005.

BAUMANN, M.A. Nickel-titanium: options and challenges. **Dental Clinics of North America**, v.48, p. 55–67, 2004.

BERNABÉ, P.F.E.; HOLLAND, R. **Cirurgia paraendodôntica: como praticá-la com embasamento científico**. 2ª edição. São Paulo: Artes Médicas, p. 657-797; 2004.

BERUTTI, E.; CHIANDUSSI, G.; PAOLINO, DS.; CANTATORE, G.; CASTELLUCCI, A.; PASQUALINI, D. Canal shaping with WaveOne Primary reciprocating files and ProTaper system: a comparative study. **Journal of Endodontic**, v. 38, n. 4, p. 505-9, 2012

BRANDAO, M. H.; GONTIJO, B. Contact sensitivity to metals (chromium, cobalt and nickel) in childhood. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 2, p. 269-76, 2012.

CIVJAN, S.; HUGET, E.F.; DESIMON, L.B. Potencial applications of certain nickel-titanium (nitinol) alloys. **Journal of Dental Research**, v. 54, n.1, p 89-96, 1975.

COHEN, S. e HARGREAVES, K.. **Caminhos da Polpa**. Rio de Janeiro. Elsevier; 2007.

CORREIA DE SOUSA, J.; BRAGA, A.N.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M.F. Prevalência da fratura dos instrumentos endodônticos por alunos de pré- graduação: estudo clínico retrospectivo de 4 anos. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 54, n.3, p. 150-155, 2013.

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects e oxidative stress. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 412-425, 2008.

DENKHAUS, E; SALNIKOW, K. Nickel esesntiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, p. 25-56, 2002.

DIAS, D.S.; RIBEIRO, G.D.; MARTUCHE, R.S.; ANTUNES, H.S.; VIEIRA, V.T.L.; SILVA, E.J.N.L. Análise morfométrica e flexão rotativa de instrumentos tipo K de uma empresa nacional. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, n. 2, p. 96-100, 2017.

ELIAS, C.N.; LOPES, H.P. **Materiais dentários – ensaios mecânicos**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Livraria Santos Editora; 2007.

ELIAS, C.N.; LOPES, H.P.; AMARAL, G.; MATHEUS, T.C.U.; MOREIRA, E.J.L.; MANGELLI, M. Resistência à flambagem de instrumentos endônticos empregados no cateterismo de canais radiculares atresiadados. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 65, n. 1, p.12-17, 2008.

ELNAGHY, A. Cyclic fatigue resistance of ProTaper Next nickel-titanium rotary files. **International Endodontic Journal**, v. 47, p 1034–9, 2014.

ESPOSITO, P.T.; CUNNINGHAM, C. A comparison of canal preparation with nickel-titanium and stainless steel instruments. **Journal of Endodontic**, n. 21, p 173-6, 1995

ES-SOUNI, M.; ES-SOUNI, M.; FISCHER-BRANDIES, H. Assessing the biocompatibility on Niti shape memory alloys used for medical applications. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 557-567, 2005.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. **Macrophages in inflammation**. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–6, 2005.

GAMBARINI, G.; PLOTINO, G.; GRANDE, N.M.; AL-SUDANI, D.; DE LUCA, M.; TESTARELLI, L. Mechanical properties of nickeltitanium rotary instruments produced with a new manufacturing technique. **International Endodontic Journal**, v. 44, p. 337–41, 2011.

GAO, Y.; SHOTTON, V.; WILKINSON, K. Effects of raw material and rotational speed on the cyclic fatigue of ProFile Vortex rotary instruments. **Journal of Endodontic**, v. 36, p. 1205-1209, 2010.

GAVINI, G.; CALDEIRA, C.L.; AKISUE,, E.; CANDEIRO, G.T.,; KAWAKAMI, D.A. Resistance to flexural fatigue of Reciproc R25 files under continuous rotation and reciprocating movement. **Journal of Endodontic**, v.38, p684-687, 2012.

GERGI, R.; RJEILY, J. A.; SADER, J.; NAAMAN, A. Comparison of canal transportation and centering ability of twisted files, Pathfile-ProTaper system, and stainless steel hand K-files by using computed tomography. **Journal of Endodontic**, n. 36, 2010.

ISO 10993-5 **Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**.

ISO 10993-5 **Biological evaluation of medical devices** -- Part 12: Sample preparation and reference materials

JOHNSON, E.; LLOYD, A.; KUTTLER, S.; NAMEROW, K. Comparison between a novel nickel-titanium alloy and 508 nitinol on the cyclic fatigue life of ProFile 25/.04 rotary instruments. **Journal of Endodontics**, v. 34, 1406– 9, 2008.

JONES, J.A.; CHANG, D.T.; MEYERSON, H.; COLTON, E.; KWON, I.K.; MATSUDA, T.; ANDERSON, J.M. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. **Journal of Biomedicine**, 2007.

JORGE, J.H.; GIAMPAOLO, E.T.; PAVARINA, A.C. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.33, p. 65-8, 2004.

KELL, T.; AZARPAZHOOH, A.; PETERS, O.A.; EL-MOWAFY, O.; TOMPSON, B.; BASRANI, B. Torsional profiles of new and used 20/.06 GT series X and GT rotary endodontic instruments. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 1278– 81, 2009.

KEROSUO, H.; KULLAA, A.; KEROSUO, E.; KANERVA, L.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Nickel allergy in adolescents in relation to orthodontic treatment and piercing of ears. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 109, p.148-54, 1996.

KESKIN, C.; INAN, U.; DEMIRAL, M; KELES, A. Resistência cíclica à fadiga dos instrumentos alternativos Reciproc Blue, Reciproc e WaveOne Gold. **Journal Endodontic**, v.43, n.8, p.1360–1363, 2017.

KIM, H.; JOHNSON, J. W. Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickeltitanium, and titanium orthodontic wires. **Angle Orthodontist**, v. 69, n. 1, p. 39-44, 1999.

KUSY, R.P. Types of corrosion in removable appliances: annotated cases and preventive measures. **Clinical Orthodontics and Research**, v.3, p. 230-209, 2000.

LARSEN, C.M.; WATANABI, I.; GLICKMAN, G.N.; HE, G. Cyclic fatigue analysis of a new generation of nickel titanium rotary instruments. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 401– 3, 2009.

LOPES, H.P.; ELIAS, C.N.; VIEIRA, M.V.B.; MANGELLI, M.; SOUZA, L.C.D.; VIEIRA, V.T.L. Fatigue life of reciproc and Mtwo instruments subjected to static and dynamic tests. **Journal of Endodontic**, v. 39, p.693–696, 2014.

LOPES, H. P.; ELIAS, C. N.; VIERA, V. T. L.; MOREIRA, E. J. L.; MARQUES, R. V. L.; OLIVEIRA, J. C. M.; DEBELIAN, G.; SIQUEIRA, J. F. Effects of electropolishing surface treatment on the cyclic fatigue resistance of BioRace nickel-titanium rotary instruments. **Journal of Endodontic**, v. 36, n. 10, 2010.

LOPES, H.P.; ELIAS, C.N; VIEIRA, M.V.B; MANGELLI, M.; SOUZA, L.C.; VIEIRA, V.T.L. Bending resistance of conventional NiTi and M-wire endodontic instruments. A comparative study. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 2, p. 170-177, 2011.

LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR, J.F. Endodontia: **Biologia e Técnica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 419-480, 2004.

LOPES, H.P., DE SOUZA, L.C.; VIEIRA, V.T.L.; SILVEIRA, A.M.V.S.; VIEIRA, M.V.B.; ELIAS, C.N. Fratura dos instrumentos endodônticos. Recomendações clínicas. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.68, p. 152-156, 2011.

MACOMBER, L.; HAUSINGER, R. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. **Metallomics**, v. 3, p. 1153-1162, 2011.

MARIANI, E; LISIGNOLI, G; BORZÌ, R.M.; PULSATELLI, L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n.3, p. 636, 2019.

MENEZES, L.M.; FREITAS, M.P.M.; GONÇALVES, T.S. Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade? **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v.14, p. 144-57, 2009.

MORAIS, L. S.; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 48-53, 2007.

MOREIRA, E. J. L. **Análise da fratura de instrumentos endodônticos de NiTi**. Tese de Doutorado apresentada no Instituto Militar de Engenharia, 150 p. 2006

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

PANTUZO, M. C. G. Z., E.G.; MARIGO, H.A.; ZENÓBIO, M.A.F.;. Hypersensitivity to conventional and to nickel-free orthodontic brackets. **Brazilian Oral Resarch**, v. 21, n. 4, p. 298-302, 2007. PAQUE, F.; ZEHNDER, M.; DE-DEUS, G. Microtomography-based comparison of reciprocating single-file F2 ProTaper technique versus rotary full sequence. **Journal of Endodontic**, v. 37, n.10, p.1394-7, 2011.

PARASHOS, P.; GORDON, I.; MESSER, H.H. Factors influencing defects of Rotary nickeltitanium endodontic instruments after clinical usa. **Journal of Endodontics**, v. 10, p. 722-5, 2004.

PARASHOS, P., MESSER, H. H.. Rotary NiTi instrument fracture and its consequences. **Jounal of Endodontics**, v. 32, n.11, p.1031-43, 2006.

PAZZINI, C. A. et al. Allergy to nickel in orthodontic patients: clinical and histopathologic evaluation. **General dentistry**, v. 58, n. 1, p. 58-61, Jan-Feb 2010.

PEDULLA, E.; GRANDE, N. M.; PLOTINO, G. Cyclic fatigue resistance of two reciprocating nickel-titanium instruments after immersion in sodium hypochlorite. **International Endodontic Journal**, v. 46, v.2, p. 155-9, 2013.

PEIXOTO, I.F.C.; PEREIRA, E.S.J.; SILVA, J.G.; VIANA, A.C.D.; BUONO, V.T.L.; BAHIA, M.G.A. Flexural fatigue and torsional resistance of ProFile GT and ProFile GT series X instruments. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 741–4, 2010.

PRICHARD, J. Rotation or reciprocation: a contemporary look at NiTi instruments? **Brazil Dental Journal**, v. 212, n.7, p. 345-6, 2012.

RAHILLY, G. P., N. Current Products and Practice Nickel allergy and orthodontics. **Journal of Ortodontics**, v. 30, p. 171-174, 2003

SANTOS, R.L.; PITHON, M.M.; OLIVEIRA, M.V.; MENDES, G.S.; ROMANOS, M.T.V.; RUELLAS, A.C.O. Cytotoxicity of introral orthodontic elastics. **Brazilian Journal of Oral Science**, v.7, p. 1520-5, 2008.

SATTAPAN, B.; NERVO, G. J.; PALAMARA, J. E. MESSER, H.H. Defects in rotary nickel-titanium files after clinical use. **Journal of Endodontic**, v. 26, n. 3, p. 161-5, 2000.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dental Clinics of North America**, v. 18, p. 269–96, 1974.

SERENE, T. P. et al . Nickel-titanium instruments. Aplications in Endodontic . St. Louis: **Ishiyaku Euroamerica Inc.**, 1995.

SILVA, E.J.N.L.; SÁ, L.; BELLADONNA, F.G.; NEVES, A.A.; ACCORSI-MENDONÇA, T.; VIEIRA, V.T.; DE-DEUS, G.; MOREIRA, E.J. Reciprocating versus rotary systems for root filling removal: Assessment of the apically extruded material. **Journal of Endodontic**, v. 40, p. 2077–2080, 2014

SKOGLUND, A.; EGELRUD, T. Hypersensitivity reactions to dental materials in patients with lichenoid oral mucosal lesions and in patients with burning mouth syndrome. **Scandinavian Journal Of Dental Research**, v. 99, p. 320-8,1991.

SOSROSENO, W. The Immunology of Nickel-Induced Allergic Contact Dematitis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 13, p. 173-181, 1995.

TESTARELLI, L.; PLOTINO, G., AL-SUDANI, D.; VINCENZI, V.; GIANSIRACUSA, A.; GRNADE, N.M.; GAMBARINI, G. Bending properties of a new nickel-titanium alloy with a lower percent by weight of nickel. **Journal of Endodontic**, v. 37, n. 9, p. 1293-1295, 2011.

THOMPSON, S.A. An overview of nickel–titanium alloys used in dentistry. **International Endodontic Journal**, v. 33, p. 297-310, 2000.

TRIPI, T.R.; BONACCORSO, A.; CONDORELLI, G.G. Cyclic fatigue of different nickel-titanium endodontic rotary instruments. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 102, p. 106-114, 2006.

TURPIN, Y.L.; CHAGNEAU, F.; VULCAIN, J.M. Impact of two theoretical cross-sections on torsional and bending stresses of nickel-titanium root canal instrument models. **Journal of Endodontic**, n. 26, 2000.

VIEIRA, V.T.L.; ELIAS, C.N.; LOPES, H.P, MOREIRA, E.J.L; SOUZA, L.C. Um instrumento NiTi fabricado por torção: morfologia e propriedades mecânicas. **Dental Press Endodontics**, v. 1, n. 1, p. 21-27, 2011.

VIEIRA, V.T.L.; ELIAS, C. N.; LOPES, H. P.; MOREIRA, E. J. L.; SOUZA, L. C. D. A NiTi instrument manufactured by twisting: morphology and mechanical properties. **Dental Press Endodontics**, v. 1, n. 1, 2011.

VIEIRA, V.T.L; LOPES, H.P; ELIAS, C.N.; SOUZA, L.C.; SILVA, E.J.N.L.; PRATA, D.B.; MOREIRA, E.J.L.; VIEIRA, M.V.B. Effect of autoclave cycles on cyclic fatigue resistance of control memory NiTi files observed by scanning electron microscopy. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, p. 23, 2017.

WALIA, H.; BRANTLEY, W.; GERSTEIN, H. An initial investigation of the bending and torsional properties of nitinol root canal files. **Journal of Endodontic**, v. 14, n. 7, p. 346-351, 1988.

WEFELMEIER, M.; EVESLAGE, M.; BÜRKLEIN, S.; OTT, K.; KAUP, M. Removing fractured endodontic instruments with a modified tube technique using a light-curing composite. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 5, p. 733-736, 2015.

WESTPHALEN, G.H.; MENEZES, L.M.; PRA, D; GARCIA, G.G.; SCHMITT, V.M.; HENRIQUES, J.A. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. **Genetics and Molecular Research Journal**, v. 7, p. 1259-66, 2008

YARED, G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: preliminary observations. **International Endodontic Journal**, v.41, n. 4, p. 339-44, 2008.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.;HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: Na Overview of Uptake, Essentiality and toxicity in Plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 1-17, 2011.