

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**

JACQUELINE CARDOSO DUARTE

**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NiTi: ESTUDO DE PROPRIEDADES
MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE**

Duque de Caxias

2020

JACQUELINE CARDOSO DUARTE

**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NiTi: ESTUDO DE PROPRIEDADES
MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE**

Tese submetida ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas.

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

Duque de Caxias

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

D812i Duarte, Jacqueline Cardoso.
Instrumentos endodônticos de NiTi: estudo de propriedades mecânicas e citotoxicidade / Jacqueline Cardoso Duarte. – Duque de Caxias, 2020.
82 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2020.
“Orientadores: Prof. DSc. Victor Talarico Leal Vieira
Prof. DSc. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira”.

Referências: f. 67-75.

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

CDD – 610.28

JACQUELINE CARDOSO DUARTE

**INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS DE NiTi: ESTUDO DE PROPRIEDADES
MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE**

Tese submetida ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas.

Aprovada em: 20 de abril de 2020.



Prof.^a Dr.^a Carina Maciel da Silva Boghossian
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Carlos Nelson Elias
Instituto Militar de Engenharia – IMEC



Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO



Prof. Dr. Weber Schmidt Pereira Lopes
Universidade Estácio de Sá - UNESA

*À Deus por todo amor e cuidado que me dedica
e aos anjos que Ele coloca em meu
caminho desde que nasci.*

DEDICO ESTE TRABALHO

À Deus, por nunca me desamparar e me preencher com seu amor. Obrigada pelos lindos anjos...

Ao meu marido e melhor amigo...

André Duarte, por ser um companheiro tão paciente e melhor pai do mudo! Obrigada por amar meu caos e fazê-lo parecer gotas de orvalho numa tarde fresca... Obrigada por florescer quando eu sou primavera e por me aquecer quando sou inverno. Obrigada por me entender, por se doar ao nosso amor, por amar os bichinhos, por não me desamparar quando tenho medo e por me dar uma família incrível! Nosso Antônio está quase chegando e esse é o nosso maior projeto de vida! "Tu vens, tu vens, eu já escuto os teus sinais" ...

À minha mãe...

Por toda amizade, companheirismo e incentivo. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu tive dificuldade em acreditar. Obrigada por suas orações e vibração positiva todas as vezes que estive prestes a dar um novo passo. Eu te amo.

À família Duarte...

Nunca terei palavras para expressar a gratidão em ser acolhida com tanto amor e carinho... Obrigada por me fazer lembrar o gosto bom de viver no plural.

Aos meus filhos de 4 patinhas...

Belinha, Princesa, Biscoito, Luna, Ceci, Clarinha, Lucas, Snow, Mel e Simba, por me ensinarem sobre amor incondicional e respeito todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Leonardo Boldrini**, por ter acreditado em mim e incentivado sempre. Obrigada por seu profissionalismo, pelos puxões de orelha e toda paciência ao longo desses anos de orientação.

Ao **Prof. Dr. Victor Talarico**, pelo carinho com que me recebeu e toda dedicação ao projeto. Obrigada por todos os conselhos e pela parceria nesses anos de orientação.

À **MSc. Marjorie Dardis**, por estar ao meu lado nos dias bons e ruins dessa longa caminhada. Teria sido muito difícil sem você e impossível sem sua amizade. Que sorte a minha!

À **MSc. Priscila Borchio**, cuja generosidade jamais vi igual, gratidão por compartilhar, se doar e por ser especial em tudo que faz. Obrigada por ensinar com tanto amor e paciência tudo que aprendi sobre cultivo celular.

À **MSc. Daniella Bonfim**, por me salvar em tantos sufocos e me ensinar que “assim como peixinhos não vivem sem água, as células sofrem sem meio”. Nunca esquecerei!

Ao **Técnico Douglas Santana**, que sempre me recebeu com tanto carinho no laboratório e me ajudou inúmeras vezes... Parece que nos conhecemos há anos...

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional**, na pessoa da atual coordenadora **Prof^a. Dr^a. Carina Maciel da Silva Boghossian**, por todo apoio e solicitude ao longo destes anos de doutorado.

À **Universidade do Grande Rio**.

Ao **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**.

À **Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste**.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro concedido.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)*

RESUMO

Ligas de níquel-titânio (NiTi) apresentam propriedades de efeito de memória de forma (EMF) e superelasticidade (SE), o que permite a fabricação de instrumentos endodônticos considerados mais seguros e eficientes no preparo do canal radicular que instrumentos de aço inoxidável. O EMF confere aos instrumentos a capacidade de recuperar sua forma original após solicitação mecânica ou térmica. A SE garante um baixo módulo de elasticidade, proporcionando o preparo progressivo do canal, mesmo em casos de grandes curvaturas radiculares. As propriedades mecânicas destes instrumentos possibilitam o uso clínico acionado à motor, o que reduz o tempo de instrumentação manual. Entretanto, a fadiga da liga metálica e a carga torcional durante o preparo mecânico podem aumentar o risco de fratura do instrumento no interior do canal, sobretudo quando os instrumentos são submetidos a ciclos de aquecimento de repetição, como acontece em esterilizações sucessivas. A falha em fadiga pode comprometer o sucesso do tratamento endodôntico, pois em caso de extrusão além do ápice, a remoção do fragmento é difícil e nem sempre possível. Desta forma, um material que foi desenvolvido para atuar por tempo limitado durante o procedimento odontológico, pode se tornar residente no tecido perirradicular. O impacto deste fragmento sobre as células presentes no ligamento periodontal não foi relatado até o momento. Este trabalho utilizou de 4 grupos de instrumentos endodônticos de NiTi: K3, RaCe, K3XF e HyFlex CM, com objetivo de caracterizar os diferentes grupos, avaliar as alterações nas propriedades mecânicas, antes e após ciclagem térmica, e determinar o potencial citotóxico dos instrumentos por 2 metodologias distintas: o Contato Direto e o Contato Indireto, utilizando fibroblastos L929, e ensaios de MTT e LDH. Como resultado, foi possível observar que houve redução da flexibilidade e da resistência em fadiga em todos os instrumentos após os ciclos de autoclavagem, o que aumenta o risco de fratura durante o uso clínico repetido. HyFlex CM, o instrumento testado mais flexível quando não autoclavado, chama atenção pela redução de 62% da vida em fadiga. Os ensaios de citotoxicidade por Contato Direto permitiram avaliar o perfil citotóxico em exposição aguda e crônica, e os resultados sugerem que com 30 dias de exposição, os instrumentos reduziram a população de células viáveis e aumentaram a secreção da enzima lactato-desidrogenase, sendo o instrumento K3XF o mais citotóxico. Os ensaios por Contato Indireto permitiram avaliar a exposição aguda à extratos obtidos por diferentes tempos

de contato do instrumento com meio de cultura. Os resultados também apontam para redução de viabilidade e aumento da secreção de LDH em todos os instrumentos submetidos aos extratos obtidos com 30, 60 e 90 dias. Por esta metodologia, K3XF foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 56% e HyFlex CM, em 52%. Foi realizada uma análise de mediadores secretados após contato dos extratos com células THP-1, onde se observou que todos os instrumentos induziram atividade pró-inflamatória em resposta a todos os extratos. O instrumento K3XF apresentou maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, seguido de HyFlex CM e RaCe. Desta forma, este estudo conclui que a ciclagem térmica de repetição pode impactar no desempenho clínico dos instrumentos endodônticos de NiTi testados, e a permanência do fragmento em região periapical pode alterar a dinâmica de viabilidade celular a medida em que o tempo de exposição se torna maior.

Palavras-chave: Níquel-Títânio; fraturas de instrumentos endodônticos; vida em fadiga; flexibilidade; MTT; LDH; citocinas

ABSTRACT

Nickel-titanium (NiTi) alloys have properties of shape memory effect and superelasticity, which allows the manufacture of endodontic instruments considered safer and more efficient in preparing the root canal than stainless steel instruments. The shape memory effect gives instruments the ability to recover their original shape after mechanical or thermal stress. The superelasticity guarantees a low modulus of elasticity, providing the progressive preparation of the canal, even in cases of large root curvatures. The mechanical properties of these instruments allow clinical use driven by motor, which reduces the time of manual instrumentation. However, the fatigue of the metal alloy and the torsional load during mechanical preparation can increase the risk of fracture of the instrument inside the channel, especially when the instruments are subjected to repetitive heating cycles, as in successive sterilizations. Failure in fatigue can compromise the success of endodontic treatment, since in case of extrusion beyond the apex, the removal of the fragment is difficult and not always possible. Thus, a material that was developed to act for a limited time during the dental procedure, can become resident in the periradicular tissue. The impact of this fragment on cells present in the periodontal ligament has not been reported so far. This work used 4 groups of NiTi endodontic instruments: K3, RaCe, K3XF and HyFlex CM, with the objective of characterizing the different groups, assessing changes in mechanical properties, before and after thermal cycling, and determining the cytotoxic potential of the instruments by 2 distinct methodologies: Direct Contact and Indirect Contact, using L929 fibroblasts, and MTT and LDH tests. As a result, it was possible to observe that there was a reduction in flexibility and fatigue resistance in all instruments after the autoclaving cycles, which increases the risk of fracture during repeated clinical use. HyFlex CM, the most flexible tested instrument when not autoclaved, draws attention by the 62% reduction in fatigue life. Direct contact cytotoxicity assays allowed the evaluation of the cytotoxic profile in acute and chronic exposure, and the results suggest that with 30 days of exposure, the instruments reduced the population of viable cells and increased the secretion of the lactate dehydrogenase enzyme, being the instrument K3XF the most cytotoxic. The tests by Indirect Contact allowed to evaluate the acute exposure to extracts obtained by different contact times of the instrument with culture medium. The results also point to reduced viability and increased LDH secretion in all instruments subjected to extracts obtained at 30, 60 and 90 days. By

this methodology, K3XF was able to reduce cell viability by 56% and HyFlex CM, by 52%. An analysis of secreted mediators was performed after contacting the extracts with THP-1 cells, where it was observed that all instruments induced pro-inflammatory activity in response to all extracts. The K3XF instrument showed greater expression of pro-inflammatory cytokines, followed by HyFlex CM and RaCe. Thus, this study concludes that the repeated thermal cycling can impact the clinical performance of the tested NiTi endodontic instruments, and the permanence of the fragment in the periapical region can alter the dynamics of cell viability as the exposure time becomes longer.

Keywords: Nickel-Titanium; fractures of endodontic instruments; fatigue life; flexibility; MTT; LDH; cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de instrumentação de um canal endodôntico.....	18
Figura 2. Transformação de fases cristalinas da liga NiTi a partir da solicitação térmica ou mecânica.....	19
Figura 3. Seção reta transversal dos diferentes instrumentos de NiTi.....	24
Figura 4. Medidas obtidas por microscópio óptico da lima K3XF.....	25
Figura 5. Equação de cálculo de conicidade.....	25
Figura 6. Aparato para ensaio de flexão em 45°.....	28
Figura 7. Ilustração do dispositivo para ensaio de flexão em 45°.....	28
Figura 8. Aparato para ensaio de flexão rotativa.....	29
Figura 9. Equação para estabelecer o número de ciclos para fratura.....	29
Figura 10. Morfologia das células da linhagem L929 em cultura.....	32
Figura 11. Ilustração da placa para cultivo de L929.....	34
Figura 12. Ilustração da placa de cultivo de L929 para experimento via Contato Direto.....	34
Figura 13. Esquema ilustrativo de incubação dos instrumentos endodônticos para obtenção do extrato para ensaio via Contato Indireto.....	35
Figura 14. Microscopia óptica do instrumento RaCe.....	40
Figura 15. Difratoograma de raio X dos instrumentos RaCe e K3.....	42
Figura 16. Difratoograma de raio X do instrumento HyFlex CM.....	43
Figura 17. Difratoograma de raio X do instrumento K3XF.....	43
Figura 18. Aresta lateral de corte dos instrumentos K3.....	44
Figura 19. Geometria da ponta, porção média da parte ativa e interseção com o intermediário dos instrumentos.....	45
Figura 20. Superfície de acabamento dos instrumentos.....	46
Figura 21. Proliferação de células L929 ao longo do tempo.....	52
Figura 22. Avaliação da integridade da monocamada durante teste preliminar por Contato Direto.....	53
Figura 23. Viabilidade de células L929, por MTT, via Contato Direto.....	55
Figura 24. Liberação de LDH por células L929, via Contato Direto.....	57
Figura 25. Viabilidade de células L929, por MTT, via Contato Indireto.....	59
Figura 26. Liberação de LDH por células L929, via Contato Indireto.....	61

Figura 27. Principais citocinas secretadas por células THP-1 após Contato Indireto com extratos de 15, 30, 60 e 90 dias.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas cristalinas presentes no sistema NiTi.....	20
Tabela 2. Distribuição dos instrumentos em grupos em função do número de ciclos de esterilização.....	27
Tabela 3. Padrões de área de superfície e volume de extrato líquido.....	31
Tabela 4. Parâmetros empregados no ensaio de proliferação celular.....	33
Tabela 5: Valores médios de diâmetro para os diferentes instrumentos e respectivas conicidades.....	41
Tabela 6. Grupo espacial, sistema cristalino e fases dos instrumentos, por DRX.....	44
Tabela 7. Microdureza Vickers de instrumentos como recebido e após ciclagem térmica.....	47
Tabela 8. Valores de força (gf) determinados pelo ensaio de flexão em 45°.....	48
Tabela 9. Número de ciclos para fratura dos instrumentos endodônticos (NCF).....	50
Tabela 10. Valores percentuais médios de absorbância em relação à média de Ctrl-, por ensaio de MTT, via Contato Direto.....	55
Tabela 11. Valores percentuais médios de absorbância em relação à média de Ctrl+, por ensaio de LDH, via Contato Direto.....	58
Tabela 12. Valores percentuais médios de absorbância em relação à média de Ctrl-, por ensaio de MTT, via Contato Indireto.....	60
Tabela 13. Valores percentuais médios de absorbância em relação à média de Ctrl+, por ensaio de LDH, via Contato Indireto.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Dental Association*

ANOVA: *Analisis of Variance*

ANSI: *American National Standards Institute*

CM: *Control Memory*

COX-2: *Ciclooxigenase-2*

Ctrl-: *Controle negativo de morte celular*

Ctrl+: *Controle positivo de morte celular*

DMEM: *Dulbecco`s Modified Eagle Medium*

DP: *Desvio Padrão*

DRX: *Difração de Raio X*

EMF: *Efeito Memória de Forma*

IL-10: *Interleucina-10*

IL-13: *Interleucina-13*

IL-1 β : *Interleucina-1 β*

IL-6: *Interleucina-6*

ISO: *Internacional Organization for Standardization*

LDH: *Lactato Desidrogenase*

MEV: *Microscopia Eletrônica de Varredura*

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

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

NCF: *Número de Ciclos para Fratura*

NiTi: *Níquel-titânio*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PGE-2: *Prostaglandina-2*

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: *Soro Fetal Bovino*

SNK: *Student-Newman-Keuls*

SE: *Superelasticidade*

TNF- α : *Fator de Necrose Tumoral- α*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.	JUSTIFICATIVA	22
4.	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL.....	23
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS.....	24
5.2	CARACTERIZAÇÃO.....	25
5.2.1	Análise Morfometria	25
5.2.2	Difração de Raio X	25
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	26
5.3	ESTERILIZAÇÃO DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS MECÂNICOS.....	26
5.4	ENSAIOS MECÂNICOS.....	27
5.4.1	Microdureza Vickers	27
5.4.2	Flexão em 45°	27
5.4.3	Flexão Rotativa	29
5.5	PREPARAÇÃO DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	30
5.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	30
5.6.1	Manutenção da Linhagem L929	31
5.6.2	Manutenção da Linhagem THP-1	32
5.6.3	Estudos Preliminares ao Ensaio de Contato Direto: Proliferação Celular e Integridade da Monocamada	32
5.6.4	Ensaio de Contato Direto	33
5.6.5	Obtenção de Extratos para Contato Indireto	34
5.6.6	Ensaio de Contato Indireto	36
5.6.7	MTT	36
5.6.8	Liberção de LDH	37
5.6.9	Análise de Mediadores Secretados	37
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5.8	ORGANOGRAMA DE CARACTERIZAÇÃO.....	38
5.9	ORGANOGRAMA DE ENSAIOS MECÂNICOS.....	39

5.10	ORGANOGRAMA DE ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	39
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1	CARACTERIZAÇÃO.....	40
6.1.1	Análise Morfométrica.....	40
6.1.2	Difração de Raio X.....	41
6.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	44
6.2	ENSAIOS MECÂNICOS.....	46
6.2.1	Microdureza Vickers.....	46
6.2.2	Flexão em 45°.....	47
6.2.3	Flexão Rotativa.....	49
6.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	51
6.3.1	Ensaio de Proliferação Celular.....	51
6.3.2	Integridade da Monocamada.....	53
6.3.3	MTT Via Contato Direto.....	53
6.3.4	Liberção de LDH Via Contato Direto.....	56
6.3.5	MTT Via Contato Indireto.....	58
6.3.6	Liberção de LDH Via Contato Indireto.....	60
6.3.7	Análise de Mediadores Secretados.....	63
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A – Média e DP dos valores de citocinas secretadas por células THP-1 após contato com extratos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	76
	ANEXO A – Trabalhos apresentados relacionados ao projeto de pesquisa proposto.....	78
	ANEXO B – Trabalhos publicados relacionados ao projeto de pesquisa proposto.....	80

1. INTRODUÇÃO

O emprego de instrumentos endodônticos de Níquel-Titânio (NiTi) acionados à motor proporcionou maior segurança durante o preparo cônico e progressivo de canais radiculares. Isto porque estas ligas apresentam duas propriedades que as permitem ser classificadas como “materiais funcionais inteligentes”: o efeito memória de forma e a superelasticidade. No primeiro caso, a propriedade confere capacidade de recuperação da forma original do instrumento após ser solicitado térmica ou mecanicamente. A superelasticidade é observada pelo baixo valor de módulo de Young, quando estas ligas são comparadas a outras, como aço inoxidável, favorecendo um preparo cônico e progressivo do canal, com bom prognóstico mesmo em canais radiculares de curvaturas mais complexas (Es-Souni *et al.*, 2005; Testarelli *et al.*, 2011).

Embora sejam materiais mais seguros e mais eficientes no preparo do canal radicular quando comparados ao aço inoxidável, os instrumentos rotatórios de NiTi também estão suscetíveis à fratura no interior do canal devido à fadiga, que ocorre pela repetição de ciclos de tração e compressão durante o preparo mecânico de um canal curvo, e pode ser precipitada de acordo com o número de esterilizações ao longo de sua vida útil do instrumento, em função de alterações físico-químicas (Basrani *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2017).

Cabe ao endodontista avaliar a relação risco *versus* benefício na remoção do fragmento fraturado, pois a retirada pode indicar a necessidade de um novo procedimento invasivo, como a cirurgia paraendodôntica. A localização do fragmento pode impactar de forma significativa no tratamento. Caso esteja posicionado de maneira a limitar a desinfecção químico-mecânica do sistema radicular, a permanência do instrumento pode resultar no insucesso do tratamento. Outro parâmetro que pode influenciar na tomada de decisão é o fato de que ainda não há relato na literatura que contemple de forma integral os efeitos da liga de NiTi sobre as células residentes do ligamento periodontal em caso de extrusão do fragmento além do ápice e, portanto, os riscos de citotoxicidade pela corrosão natural desses metais quando os mesmos são mantidos no interior do canal, não estão elucidados (Shen *et al.*, 2004; Wefelmeier *et al.*, 2015).

A fim de auxiliar a tomada de decisão sobre o gerenciamento do fragmento no sistema radicular, torna-se relevante o estudo dos fatores que levam à fratura dos

instrumentos durante a utilização clínica, bem como o conhecimento dos efeitos gerados pelo processo de esterilização por autoclavagem sobre as propriedades mecânicas das ligas NiTi, e as alterações sobre a viabilidade de células quando expostas à liga metálica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O tratamento endodôntico tem como objetivo a desinfecção e modelagem de canais radiculares, a fim de permitir uma obturação adequada do sistema, promovendo controle do processo infeccioso e da periodontite apical. E para que o tratamento tenha sucesso, o preparo do canal radicular é uma fase crucial, implicando no uso de instrumentos endodônticos com capacidade de penetração, alargamento, corte e remoção mecânica do tecido dentinário (Dias *et al.*, 2017), como mostra a Figura 1.

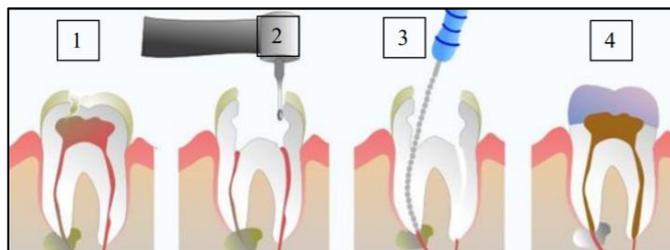


Figura 1. Sequência de instrumentação de um canal endodôntico: Elemento acometido (1), Acesso endodôntico (2), Instrumentação (3), Obturação (4) (Aboud, 2012)

A utilização de instrumentos endodônticos fabricados a partir de ligas metálicas de NiTi é relativamente recente, com primeiros relatos na década de 80. A implementação da liga impactou de forma expressiva na segurança de utilização clínica. Isto se deve às propriedades de efeito memória de forma (EMF) e superelasticidade (SE) encontradas na mistura binária equiatômicas dos metais. Estas propriedades estão relacionadas a transformações cristalográficas reversíveis entre a fase matriz, a austenita cúbica de corpo-centrado (B2), para martensita monoclinica (B19'), originando um material com capacidade de recuperar a forma original após ser solicitado térmica ou mecanicamente, como observado na Figura 2, e com menor módulo de elasticidade, quando comparado aos instrumentos fabricados a partir de

aço inoxidável de mesmo diâmetro. A maior flexibilidade favorece um preparo cônico e progressivo do canal, com bom prognóstico mesmo nos casos com grandes curvaturas radiculares (Es-Souni *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2011; Peres *et al.*, 2012; Sgambitterra *et al.*, 2019).

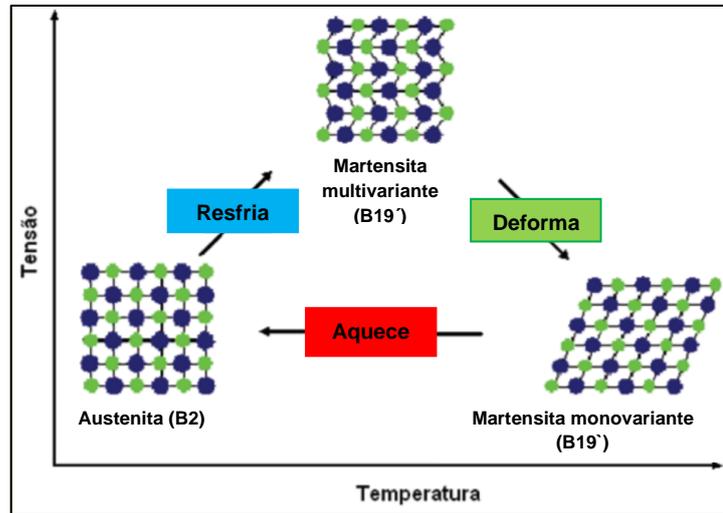
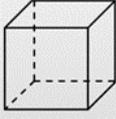
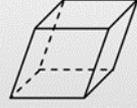
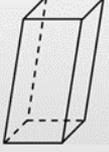


Figura 2. Transformação de fases cristalinas da liga NiTi a partir da solicitação térmica ou mecânica: superelasticidade (Adaptado de Castilho & Silva, 2011)

Além das fases B2 e B19', a fase R ou romboédrica pode ser encontrada no sistema NiTi (Tabela 1). Os instrumentos que contêm a fase R são fabricados pela empresa SybronEndo, que patenteou um tratamento térmico da liga de NiTi capaz de estabilizar esta fase à temperatura ambiente, permitindo até mesmo a sua torção durante a fabricação. Para isso, foi necessário enriquecer a liga com Ni (Vieira *et al.*, 2011). A fase R é metaestável na liga NiTi convencional e pode ocorrer transitoriamente entre as fases B2 e B19'.

Tabela 1. Estruturas cristalinas presentes no sistema NiTi: B2 (Fase matriz), B2' ou R e B19'

Fases presentes nas ligas do sistema NiTi			
Célula unitária			
Fase	Austenita	Martensita	Martensita
Simetria	Cúbica	Romboédrica	Monoclinica
Nomenclatura	B2	B2' ou R	B19'

(Adaptado de Vieira, 2013)

As propriedades mecânicas das ligas NiTi favoreceram a utilização clínica dos instrumentos acionados à motor. Desta maneira, os instrumentos são acoplados a um motor elétrico, onde são configurados a velocidade e o torque, minimizando a necessidade da instrumentação manual pelo endodontista. Estes instrumentos rotatórios ficam suscetíveis à fratura no interior do canal devido à fadiga da liga metálica durante o preparo mecânico, ou à carga torcional. Pode ocorrer também uma falha mista, com a combinação de componentes de fadiga e torção. A fadiga em flexão rotativa ocorre pela ação do movimento rotatório livre no centro da curvatura de um canal, submetendo o instrumento a ciclos de tensão e compressão no ponto máximo de flexão, quando o mesmo trabalha de forma contínua. Nesta situação, ocorrem mudanças microestruturais cumulativas (discordâncias) inerentes da deformação plástica, que levam à nucleação, crescimento e propagação de trincas. A falha por torção ocorre quando a carga de torque rotacional aplicada excede o limite de torque do instrumento. Um exemplo ocorre quando o mesmo é aprisionado no interior do canal radicular e o motor continua exercendo o giro, levando à fratura (Basrani *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2017; Sgambitterra *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2015).

Novas técnicas de fabricação são desenvolvidas com objetivo de melhorar a performance e segurança dos instrumentos de NiTi, como por exemplo, o uso de tratamentos termomecânicos especiais, gerando os atualmente conhecidos instrumentos com Memória Controlada (CM) ou mesmo instrumentos martensíticos, capazes de proporcionar maior flexibilidade e melhor resposta à fadiga. Os tratamentos térmicos são de domínio patentário de cada fabricante (Shen *et al.*, 2011).

Comumente os fabricantes recomendam a esterilização dos instrumentos antes da utilização clínica, o que é endossado pela *American Dental Association* para o controle de infecção (ADA, 1996). Entretanto, a integridade aparente desses instrumentos após o uso e a ausência de regulamentação sobre o número máximo de esterilizações, fomenta a reutilização em novos procedimentos e, portanto, ciclagem térmica de repetição. Sabe-se que o aquecimento das ligas NiTi poderia impactar em alterações na rede cristalina original do instrumento, implicando em risco de fadiga ao longo do uso clínico (Casper *et al.*, 2011; Hifler *et al.*, 2011).

A fratura dos instrumentos endodônticos constitui uma preocupação comum para os profissionais endodontistas e, embora as técnicas atuais tenham melhorado as chances de remoção do fragmento, nem sempre o processo é bem sucedido, implicando na necessidade de acompanhamento pós-procedimento. Além disso, não existem protocolos universais que auxiliem a decisão do profissional em remover ou não o fragmento. Em geral, observa-se as condições de ocorrência, como localização anatômica e possibilidade de acesso, tamanho do fragmento, e técnicas disponíveis para a remoção. Essas questões são particulares e devem ser tratadas caso a caso, considerando-se o equilíbrio entre as possíveis complicações e a taxa de sucesso. Por exemplo, se um fragmento estiver posicionado de maneira a limitar a desinfecção do sistema radicular, pode desfavorecer o prognóstico. Em contrapartida, a remoção de um fragmento na porção apical pode implicar em riscos de extrusão além do forame e/ou necessidade de uma cirurgia parendodôntica (Parashos & Messer, 2006; Wefelmeier *et al.*, 2015).

Um estudo retrospectivo avaliou 8460 pacientes submetidos ao tratamento de canal entre os anos de 1990 a 2003, e constatou a presença de um ou mais fragmentos em 277 pacientes, sendo 78% instrumentos rotatórios de NiTi. Os resultados não apontam para a periculosidade de utilização dos instrumentos, mas para um reflexo direto da alta adesão das ligas NiTi frente ao aço inoxidável, cuja prevalência de fratura antes da década de 80 se mostrava ainda mais alarmante (Spili *et al.*, 2005).

Os achados de Spili e colaboradores (2005) podem ainda sugerir que o número real de fraturas seja maior, pois o estudo apenas contemplou os casos em que os fragmentos foram observados por meio de radiopacidade, excluindo os casos em que a remoção do instrumento foi o procedimento adotado. Desta forma, estudar os mecanismos que levam à fratura dos instrumentos se torna relevante para a

segurança de uso clínico, sobretudo quando estes instrumentos são submetidos à esterilização em autoclave, pois a ação térmica pode impactar em alterações significativas na natureza físico-química das ligas, tornando-as mais susceptíveis à fratura.

Um outro fator a ser considerado é a possibilidade de extrusão da parte fraturada pelo forame apical durante a tentativa de remoção do fragmento. Isto vai promover o contato direto da liga metálica com células residentes do tecido periapical. O contato pode ser de curto prazo, pelo tempo necessário para a finalização do procedimento de remoção, ou de longo prazo, em casos de não remoção. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos desta liga metálica sobre as células do ligamento periodontal.

As ligas NiTi são extensamente investigadas para aplicações na indústria biomédica, sobretudo em implantes de natureza cardiovascular, e por este motivo, os estudos sobre o tema abordam testes *in vitro* utilizando linhagens celulares afins para determinar a biocompatibilidade e, mais recentemente, para estimar a hemocompatibilidade. Entretanto, os mesmos estudos mostram que a compatibilidade dessa liga pode ser reduzida em função de determinadas condições, dentre as quais, a liberação de grandes concentrações de íons, sobretudo de níquel, durante o processo de corrosão, acarretando redução da viabilidade celular (Armitage, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Apesar do grande número de estudos e de todo conhecimento gerado a respeito das propriedades mecânicas dos instrumentos endodônticos de NiTi acionados por motor, o risco de fratura é uma realidade na clínica. Este evento acontece por um defeito importante na superfície do instrumento, por fadiga do material, ou mesmo por torção. Portanto, o comportamento mecânico dos instrumentos nas diferentes ligas deve ser investigado na tentativa de gerar conhecimento capaz de aumentar a segurança de utilização clínica.

Na ocorrência de fratura do instrumento, a remoção do fragmento no interior do canal nem sempre é um procedimento simples. Em alguns casos só é possível através de um novo procedimento cirúrgico, podendo causar danos significantes à estrutura radicular. Por esta razão, quando a avaliação preliminar do procedimento indica que os riscos não justificam a remoção, o fragmento é sepultado no interior do canal.

A escassez de estudos voltados ao comportamento de células do ligamento periodontal frente à residência dos fragmentos de NiTi na porção apical, foi a principal motivação para a realização deste trabalho, que busca ainda contribuir para a tomada de decisão do endodontista e aumentar a taxa de sucesso do tratamento de canal.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação de propriedades mecânicas após ciclagem térmica e a citotoxicidade de instrumentos endodônticos fabricados em ligas NiTi com diferentes tratamentos térmicos: RaCe[®], HyFlex CM[®], K3[®], K3XF[®].

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a geometria dos instrumentos atende a norma ANSI/ADA nº 101, 2001 (American National Standard Institute/ American Dental Association);
- Determinar a(s) fase(s) cristalinas e a microdureza para cada tipo de liga;
- Determinar diferença de flexibilidade entre os grupos;
- Determinar a resistência em fadiga e tipo de fratura;
- Verificar se a esterilização interfere na microdureza, flexibilidade e vida em fadiga;
- Estudar de forma comparativa o potencial citotóxico da liga NiTi, através da viabilidade de células L929, por meio de duas metodologias distintas de exposição: via Contato Direto e via Contato Indireto, ambas previstos pela ISO 10993-5:2009 (International Organization for Standardization);
- Analisar mediadores secretados por células do tipo THP-1, através da metodologia de Contato Indireto, a fim de relacionar a presença de importantes proteínas ao caráter citotóxico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 INSTRUMENTOS ENDODÔNTICOS

O estudo adotou 4 tipos de instrumentos fabricados a partir de ligas NiTi e com tratamentos térmicos distintos e mesma geometria (0,25mm de diâmetro da ponta e conicidade 0,06mm/mm):

- RaCe® (FGK Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça): produzido com liga NiTi tradicional
- K₃® (SybronEndo, Califórnia, EUA): produzido com liga NiTi tradicional
- K₃XF® (SybronEndo, Califórnia, EUA): produzido com liga NiTi em fase-R
- HyFlex CM® (Contene/ Whaledent Inc., Ohio, EUA): produzido com liga CM

O desenho da secção transversal está representado na Figura 3, como diâmetro da base da ponta, conicidade e secção reta transversal. Os instrumentos foram categorizados em grupos: Grupo 1 - RaCe, Grupo 2 – HyFlex CM, Grupo 3 - K₃ e Grupo 4 - K₃XF.

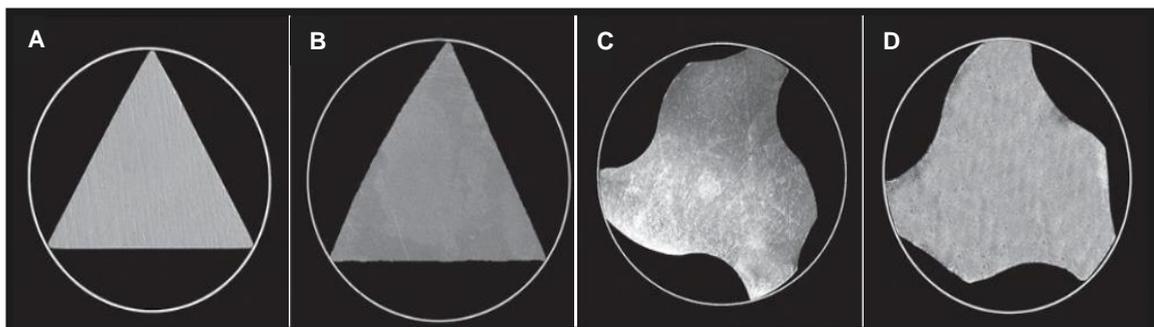


Figura 3. Seção reta transversal dos diferentes instrumentos de NiTi: RaCe (A), HyFlex CM (B), K₃XF (C), K₃ (D) (Lopes & Siqueira Junior, 2004)

5.2 CARACTERIZAÇÃO

5.2.1 Análise Morfométrica

A morfometria foi realizada em lupa binocular estereoscópica Opticam[®], e as imagens foram observadas através do *software* TS-View[®], com escala ajustada em 0,51mm, como mostra a Figura 4. Avaliou-se a base da ponta (D0), com aumento de 5x, e os diâmetros D3 e D9 (à 3 e 9 mm da ponta, respectivamente), em aumento de 2x. Para cálculo de conicidade, empregou-se a equação exposta na Figura 5, de acordo com o item 6.3.3.2 da norma ANSI/ADA nº 101, 2001.

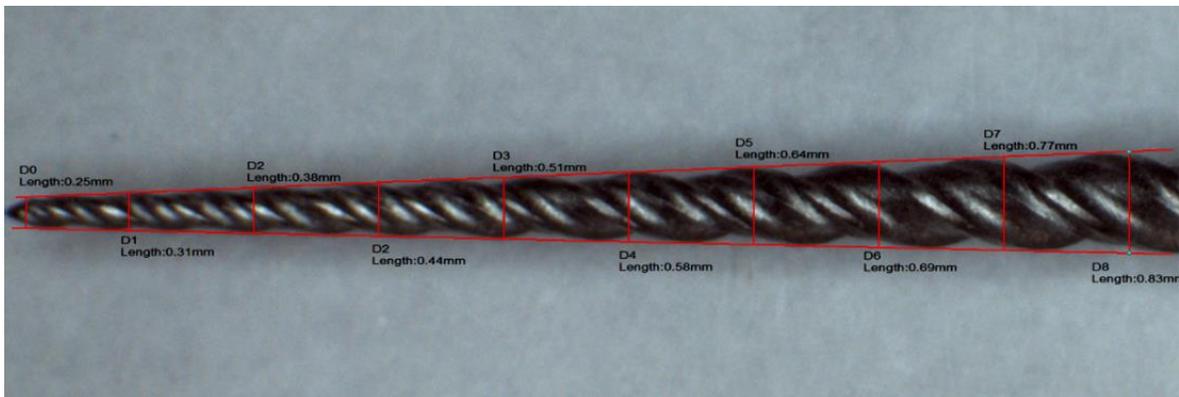


Figura 4. Medidas obtidas por microscópio óptico da lima K3XF.

Escala ajustada em 0,51mm

$$C = \frac{D9 - D3}{d}$$

Figura 5. Equação de cálculo de conicidade, onde: C = conicidade, D9 = diâmetro à 9mm da ponta do instrumento, D3 = diâmetro à 3mm da ponta do instrumento, d = distância entre D9 e D3

5.2.2 Difração de Raio X

Para a difração de raio X (DRX), os instrumentos foram fixados em uma placa de vidro com auxílio de uma fita adesiva dupla-face. Utilizou-se o difratômetro PANalytical X'Pert Pro[®], em configuração foco de linha, feixe de Cobalto e filtro de Fe,

em tensão de 45kV e corrente elétrica de 40mA. O difratograma foi gerado no programa HighScore Plus® 4.7.0 e os picos dos planos cristalográficos foram comparados com as fichas correspondentes as ligas NiTi, para que fossem detectadas as possíveis fases (B2 – austenita, B19' – martensita e R – romboédrica).

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em microscópio Quanta FEI 250® em dois momentos distintos: instrumentos como recebidos, e instrumentos após ensaio flexão rotativa, a fim de verificar o acabamento, possíveis distorções e a natureza da fratura.

5.3 ESTERILIZAÇÃO DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS MECÂNICOS

Os grupos foram divididos em 3 subgrupos (n=10/ grupo): instrumentos não esterilizados, esterilizados 2 vezes e esterilizados 4 vezes, como mostra a tabela 2, com intervalo de aproximadamente 60 minutos entre esterilizações, em temperatura ambiente. Foram utilizados os seguintes parâmetros: $T=136\pm 2^{\circ}\text{C}$, $t = 60\text{min}$, $P=0,22\text{MN/m}^2$. Estes parâmetros são pré-programados nas autoclaves de utilização em consultório odontológico (autoclavagem).

Tabela 2. Distribuição dos instrumentos em grupos em função do número de ciclos de esterilização

Grupo (n=30)	Nome comercial	Tipo de liga do instrumento	Subgrupo (n=10)	Número de ciclos de esterilização
1	K ₃ [®]	NiTi convencional	A	0
			B	2
			C	4
2	HyFlex CM [®]	Memória controlada	A	0
			B	2
			C	4
3	RaCe [®]	NiTi convencional	A	0
			B	2
			C	4
4	K ₃ XF [®]	Fase-R	A	0
			B	2
			C	4

5.4 ENSAIOS MECÂNICOS

5.4.1 Microdureza Vickers

Para determinar a Microdureza Vickers, foi utilizada a porção intermediária dos instrumentos como recebido e após serem esterilizados. As amostras foram embutidas em baquelite, com embutidora Fortel[®] – EFD40. O lixamento foi realizado com lixadeira Fortel[®] – PLF, com lixas Norton de granulação 200, 400, 600 e 1200, e alumina de granulação 1 µm (Fortel[®]) para o polimento. Foi utilizado o microdurômetro Micromet 2003 Bueller[®]. As indentações foram feitas com 100gf durante 15s, e avaliadas em aumento de 40x.

5.4.2 Flexão em 45°

Os ensaios de flexão em 45°, ou cantilever, foram realizados em máquina de ensaio universal EMIC DL200 MF[®], com uma célula de carga de 20N, seguindo a norma nº 28 da ANSI/ADA, 2001 (Figura 6).

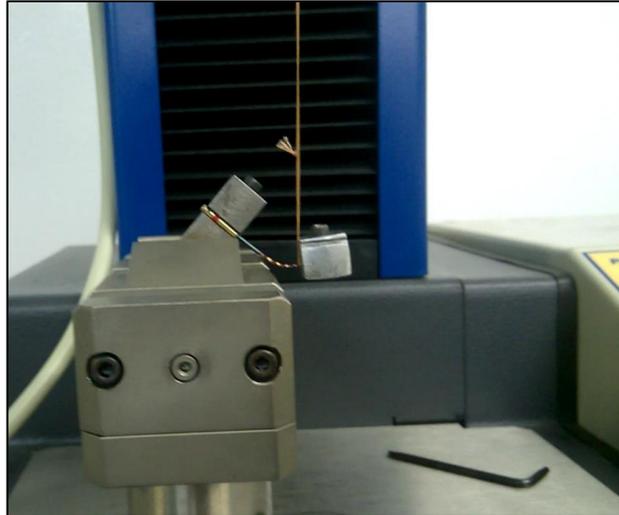


Figura 6. Aparato para ensaio de flexão em 45°

Uma morsa de aço projetada para o ensaio foi usada para imobilizar os instrumentos à 3mm da ponta. Neste ponto, aplicada a força de carga à uma velocidade de 15mm/min. Os cabos dos instrumentos foram mantidos à 45°, fixados em outra morsa (Figura 7).

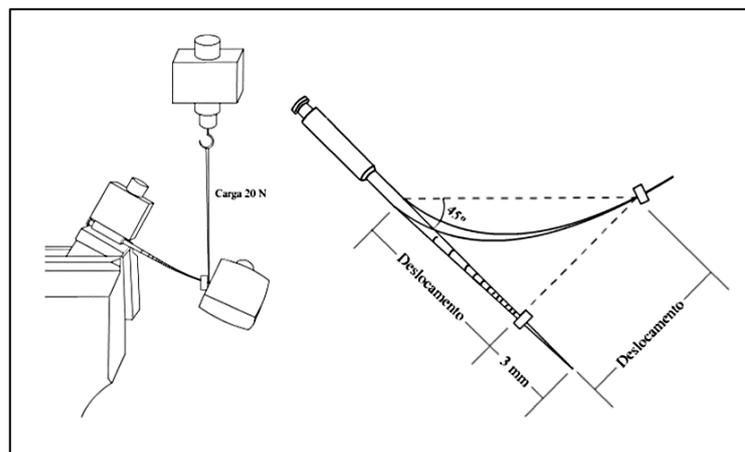


Figura 7. Ilustração do dispositivo para ensaio de flexão em 45°: à 3mm da ponta, uma força de é aplicada, à uma velocidade constante de 15mm/min, até que o instrumento esteja à 45°. Ao final do curso da ponta, a força é registrada (Soares, 2012)

Os resultados foram analisados por *software* Tesc®[®], fornecendo a força máxima (gf), as forças em três ângulos, 21°, 37° e 45°, com deslocamentos respectivos de 5mm, 10mm e 13mm, e a deformação na força máxima (mm) de instrumentos como recebidos e esterilizados.

5.4.3 Flexão Rotativa

O ensaio de flexão rotativa foi realizado nos grupos e respectivos subgrupos, com emprego de um dispositivo próprio, que buscou simular a condição clínica da instrumentação de um canal curvo. Para isso, um canal artificial confeccionado em tubo de aço foi fixado à morsa do aparelho, de modo a permitir a inserção do instrumento instalado no motor em um eixo coincidente com a direção da parte reta do canal (Figura 8A). O canal artificial apresentou centro de curvatura distando de 4,75mm da saída do canal (ponto crítico para fratura dos instrumentos), em aproximadamente 5mm da ponta, representada por D5 (Figura 8B).



Figura 8. Aparato para ensaio de flexão rotativa: posicionamento do contra ângulo do motor elétrico e do canal artificial no aparato utilizado (A); ilustração do canal (B)

O tempo da vida em fadiga dos instrumentos foi determinado como o tempo máximo em rotação para ocorrer a fratura. Este tempo foi registrado, e com a velocidade ajustada no motor (300rpm) calculou-se o número de ciclos para a fratura (NCF), como mostra a Figura 9.

$$\text{NCF} = 300 \times t$$

Figura 9. Equação para estabelecer o número de ciclos para fratura, onde: 300 representa o número de rotações por minuto e t, o tempo, em minutos, para a fratura do instrumento

5.5 PREPARAÇÃO DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os instrumentos foram mantidos imersos em solução de Extran 2%, durante 30 minutos, e enxaguados sucessivamente em banhos de 20 minutos, onde 3 foram realizados em água comum e 2 em água destilada. Em seguida, secaram em estufa à 60°C, por 2h, e foram autoclavados à 120°C, por 30min.

5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos buscaram observar a viabilidade celular, através das técnicas de MTT e liberação de LDH, via Contato Direto e indireto com células L929, e avaliar a liberação de citocinas, através de Contato Indireto com células THP-1. Os ensaios de Contato Direto e Indireto são previstos para avaliação de citotoxicidade de biomateriais pela *Internacional Organization for Standardization* (ISO 10993-5:2009).

Para o presente estudo, foram utilizados fragmentos dos instrumentos, em função da necessidade de atender a relação de Massa *versus* Volume descrita ISO 10993-5:2009 para dispositivos sólidos com formato irregular (Tabela 3), obtidos através do corte a uma determinada distância da base da ponta, até que atingissem a massa necessária em relação a capacidade volumétrica do poço de cultura.

Tabela 3. Padrões de área de superfície e volume de extrato líquido

Espessura mm	Proporção de extração (área de superfície ou massa/volume) ±10%	Formas do material
< 0,5	6 cm ² /ml	Filme, folha, estrutura tubular
0,5 a 1,0	3 cm ² /ml	estrutura tubular, placa, pequenos itens moldados
> 1,0	1,25 cm ² /ml	Itens grandes moldados
Dispositivos sólidos de forma irregular	0,2 g/ml	pó, pellets, espuma, não absorventes, itens moldados
Dispositivos porosos de forma irregular (materiais de baixa densidade)	0,1 g/ml	membranas

(Traduzido de ISO 10993-5:2009)

Os ensaios foram conduzidos utilizando linhagem L929, oriunda de fibroblastos de camundongo, e THP-1, linhagem celular monocítica humana, cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro, devidamente atestadas, para ausência de bactérias ou micoplasma, executados em triplicata, e em três experimentos independentes.

5.6.1 Manutenção da Linhagem L929

As células do tipo L929 foram mantidas em cultura, utilizando-se meio DMEM *Low* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Parte da cultura foi designada ao ensaio de Contato Direto, onde ocorreu exposição direta da monocamada ao instrumento, e outra parte, designada ao ensaio por Contato Indireto, onde a monocamada é exposta ao extrato obtido pela permanência do instrumento com meio de cultura. A morfologia da linhagem L929 pode ser observada na Figura 10, em aumento de 20x, cuja imagem foi obtida por microscópio óptico Primo Vert Zeiss® equipado com Axio Cam Erc5s®.

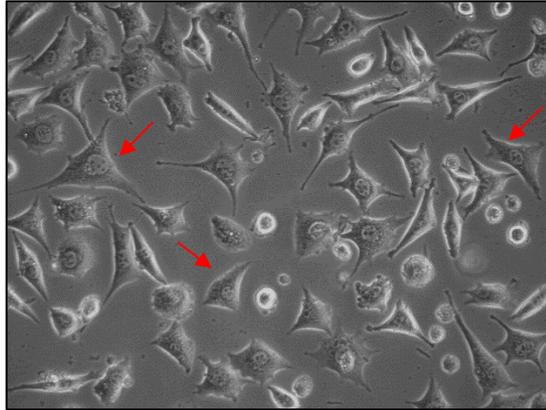


Figura 10. Morfologia das células da linhagem L929 em cultura: as setas apontam algumas células em crescimento (aumento de 20x)

5.6.2 Manutenção da Linhagem THP-1

As células monocíticas do tipo THP-1 foram mantidas em cultura, utilizando-se meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), enriquecido com 10% de SFB, em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Para a realização da análise de citocinas secretadas, as células foram induzidas à diferenciação em macrófagos com uso de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*), conforme Schutte e colaboradores, 2009. Após 72 horas do processo de indução, a monocamada subconfluenta, foi exposta ao extrato.

5.6.3 Estudos preliminares ao Ensaio de Contato Direto: Proliferação Celular e Integridade da Monocamada

Antes de realizar o ensaio de Contato Direto, se mostrou importante estabelecer o volume inicial de células por poço a ser empregado, a fim de garantir a morfologia da cultura pelo tempo máximo de exposição do instrumento, evitando que qualquer impacto sobre a viabilidade celular pudesse ser atribuído ao efeito de inibição de proliferação por contato.

Desta maneira, diferentes concentrações iniciais de células foram cultivadas em meio DMEM *Low* contendo diferentes concentrações de SFB, como representado na Tabela 4, em placas de 24 poços, e a viabilidade celular foi aferida após 1, 7, 15 e 30

dias de cultivo, utilizando Synergy H4 Hibrid Reader Biotek®, em absorvância de 630nm e interfaceado com *software* Gen5®.

Tabela 4. Parâmetros empregados no ensaio de proliferação celular

Concentração inicial	Absorbância (nm)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
1 X 10 ³ (SFB 3%)	0,232 ± 0,009	1,821 ± 0,302	3,541 ± 0,144	0,602 ± 0,209
1 X 10 ³ (SFB 10%)	0,256 ± 0,008	1,951 ± 0,142	3,257 ± 0,126	2,743 ± 1,157
3 X 10 ³ (SFB 3%)	0,299 ± 0,022	2,142 ± 0,188	3,159 ± 0,215	2,126 ± 1,103
3 X 10 ³ (SFB 10%)	0,374 ± 0,022	2,098 ± 0,164	3,121 ± 0,260	3,183 ± 0,224
5 X 10 ³ (SFB 3%)	0,415 ± 0,032	2,100 ± 0,150	3,129 ± 0,145	2,315 ± 0,360
5 X 10 ³ (SFB 10%)	0,500 ± 0,041	2,253 ± 0,145	3,195 ± 0,450	2,662 ± 0,355
7 X 10 ³ (SFB 3%)	0,490 ± 0,054	2,106 ± 0,066	3,589 ± 0,291	2,326 ± 0,484
7 X 10 ³ (SFB 10%)	0,495 ± 0,083	2,141 ± 0,265	3,137 ± 0,259	2,594 ± 1,046

Além de determinar as condições iniciais de cultivo através do ensaio de proliferação celular, observou-se a integridade da monocamada em exposição ao contato direto com instrumento, a fim de endossar que qualquer ação sobre a viabilidade da cultura fosse oriunda somente da interação com a liga NiTi e não de qualquer injúria física provocada pela morfologia do instrumento. Para isso, utilizou-se as condições que mimetizassem o maior tempo de estudo, onde as células foram cultivadas em placas de 24 poços em Contato Direto com os instrumentos, por 30 dias, com troca de meio de cultura suplementado a cada 4 dias. A integridade foi aferida em microscópio óptico Primo Vert Zeiss® equipado com Axio Cam Erc5s®, com aumento de 10x.

5.6.4 Ensaio de Contato Direto

Para o estudo da viabilidade celular por Contato Direto, as células da linhagem L929 foram cultivadas em 4 placas de 24 poços, em uma concentração inicial de 3 x

10³ células e 1000µl de DMEM *Low* + SFB 10%, por poço, e mantidas em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Foram utilizados somente 16 poços por placa, sendo os demais preenchidos com 1000µl de tampão fosfato salino (PBS – *Phosphate buffered saline*) como mostra a Figura 11.



Figura 11. Ilustração da placa para cultivo de L929

Após 36h, a linhagem já se encontrava subconfluente, como preconizado na ISO 10993:5/2009, momento em que os instrumentos foram inseridos em duplicata de poço por placa, conforme Figura 12. Cada uma das placas foi submetida aos ensaios de viabilidade respeitando o tempo de leitura: 1, 7, 15 ou 30 dias após a inserção dos instrumentos. A cultura teve meio substituído a cada 4 dias, após ciclo de 3 lavagens com 300µl de PBS.

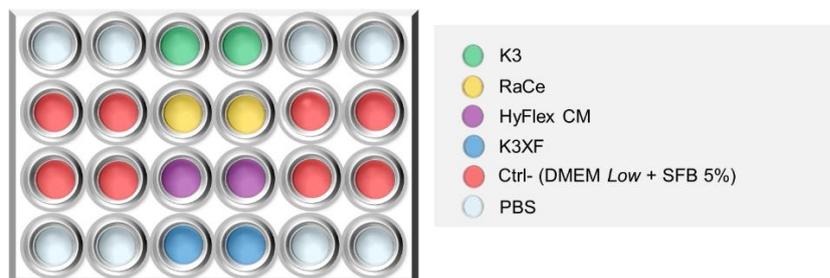


Figura 12. Ilustração da placa de cultivo de L929 para experimento via Contato Direto: cada placa de 24 poços recebeu um instrumento, com exposição em duplicata

5.6.5 Obtenção de Extratos para Contato Indireto

Para os extratos empregados no estudo de viabilidade celular, cada instrumento foi inserido em tubo falcon de 50ml, contendo 400µl de DMEM *Low*, seguindo a relação

M x V preconizada pela 10993:5/2009, e mantidos em estufa à 37° C e 5% de CO₂, por 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, conforme Figura 13.

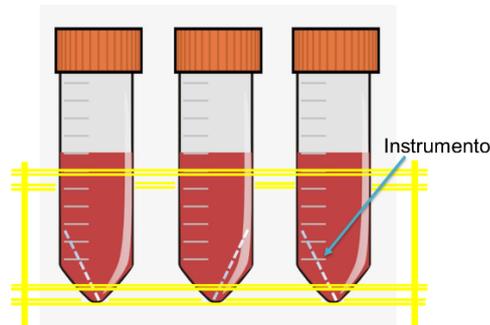


Figura 13. Esquema ilustrativo de incubação dos instrumentos endodônticos para obtenção do extrato para ensaio via Contato Indireto

Para a análise dos mediadores secretados, cada instrumento foi inserido em tubo falcon de 50ml, contendo 400µl de RPMI-1640, seguindo a relação M x V preconizada pela 10993:5/2009, e mantidos em estufa à 37° C e 5% de CO₂, por 15, 30, 60 e 90 dias, conforme Figura 13. Os tempos escolhidos para este ensaio são justificáveis pelo alto custo da técnica e pela ausência da observação de resultados significativos em menores tempos através dos ensaios de viabilidade celular.

5.6.6 Ensaio de Contato Indireto

Para análise de viabilidade celular, as células L929 foram plaqueadas em 96 poços, à uma concentração de 1×10^4 células por poço, contendo DMEM *Low* + 10% SFB. A cultura foi incubada por 24h em estufa à 37° e 5% de CO₂. Após este período, todo sobrenadante foi substituído por 100µl de extrato obtido em cada tempo e a placa foi incubada por mais 24h. Em seguida, os ensaios de MTT e liberação de LDH, foram realizados.

Para análise de mediadores secretados, as células do tipo THP-1 foram plaqueadas em 96 poços, à uma concentração de 5×10^4 células por poço, contendo RPMI-1640 e PMA, e incubadas por 72h em estufa à 37° e 5% de CO₂. Após a indução de diferenciação celular da linhagem monocítica em macrófagos, todo sobrenadante foi retirado dos poços e substituído por 100µl de extrato obtido com RPMI-1640,

seguido de incubação por 24h, em estufa à 37° e 5% de CO₂. Finalizado o período de incubação, o sobrenadante da cultura foi conduzido à análise de mediadores secretados.

É importante salientar que os instrumentos do tipo K3 não são mais fabricados atualmente. Isto porque, em 2011, a empresa responsável, SybronEndo, lançou no mercado uma nova versão, a K3XF, cujo tratamento térmico permitiu a estabilização da liga metálica em fase-R, gerando um instrumento com mais flexibilidade que a liga NiTi convencional da K3. Por esta razão, a indisponibilidade do produto no mercado não permitiu a aquisição de novos instrumentos que pudessem ser fragmentados de acordo com a relação M x V, preconizada pela 10993:5/2009, para obtenção do extrato necessário para ensaio via Contato Indireto. Entretanto, as análises se seguiram para estes instrumentos através do método de Contato Direto, uma vez que a norma não prioriza nenhum dos ensaios em detrimento do outro, e que a descontinuidade do produto não isenta dos riscos implicados durante seu uso clínico.

5.6.7 MTT

Para avaliar a viabilidade celular, utilizou-se Triton 10% como controle positivo de morte (Ctrl+). Para isto, 10% do volume de meio foi substituído pelo mesmo volume de Triton concentrado, em 4 poços onde anteriormente só havia L929 em meio, e a placa foi novamente incubada em estufa à 37°C e 5% de CO₂, por 30min. Na sequência, retirou-se todo sobrenadante dos poços adicionou-se 330µl da solução contendo reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), e a incubação ocorreu por 3h em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após este período, foi descartado todo sobrenadante e as células foram homogeneizadas com 100µl de DMSO para lise celular e solubilização da formazana gerada. Como controle negativo de morte (Ctrl-), foi empregado somente L929 com DMEM *Low* + SFB 10%, para Contato Direto, e SFB10% para o ensaio de Contato Indireto. A viabilidade celular foi aferida utilizando Synergy H4 Hibrid Reader Biotek®, em absorbância de 630nm para contato direto e 570nm para Contato Indireto, interfaceado com *software* Gen5®. Para as células do tipo THP-1, a metodologia adotada foi a mesma.

5.6.8 Liberação de LDH

Para análise da liberação de LDH (lactato desidrogenase), coletou-se 30 μ l de sobrenadante de cada um dos poços do meio de cultivo nos diferentes tempos de estudo, momentos antes de submeter as amostras à incubação com MTT. O sobrenadante foi incubado em placa de 96 poços, onde foi adicionado 30 μ l/ poço do substrato do kit comercial Cyto Tox[®] 96 Nom-Radio. A incubação ocorreu à 30°C, por 30min, em ausência de luz. Na sequência, 30 μ l/ poço da solução de parada foi adicionado, e a leitura pôde ser realizada através do Synergy H4 Hibrid Reader Biotek[®], com absorvância de 490nm e interfaceado com *software* Gen5[®].

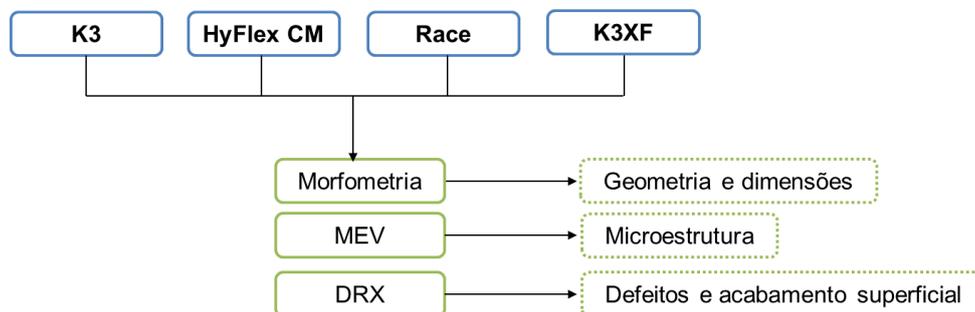
5.6.9 Análise de Mediadores Secretados

Para observação de mediadores secretados, utilizou-se o sobrenadante obtido a partir de 24h de exposição da cultura aos diferentes extratos. O sobrenadante foi analisado em placas de 96 poços, através do sistema Luminex xMAP[®] e kit comercial contendo esferas magnéticas para detecção de 27 analitos secretados da amostra (painel 27-plex: IL-1 β , 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, eotaxin, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MPC-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF). O ensaio adotou as recomendações do fabricante, seguindo parâmetros de calibração e validação do Bio-Plex Magpix[®], e curva padrão. Em seguida, ocorreu a lavagem automatizada do sistema, via Bio-Plex Pro[®], e as *beads* magnéticas foram adicionadas em cada um dos 96 poços contendo sobrenadante. As placas foram incubadas na ausência de luz, durante 1h, sobre sistema de agitação constante à 350rpm. Posteriormente, as *beads* foram ressuspensas em solução tampão fornecida pelo fabricante, sob agitação constante (1200rpm), por 30s, e as amostras foram lidas no aparelho BioPlex Magpix[®].

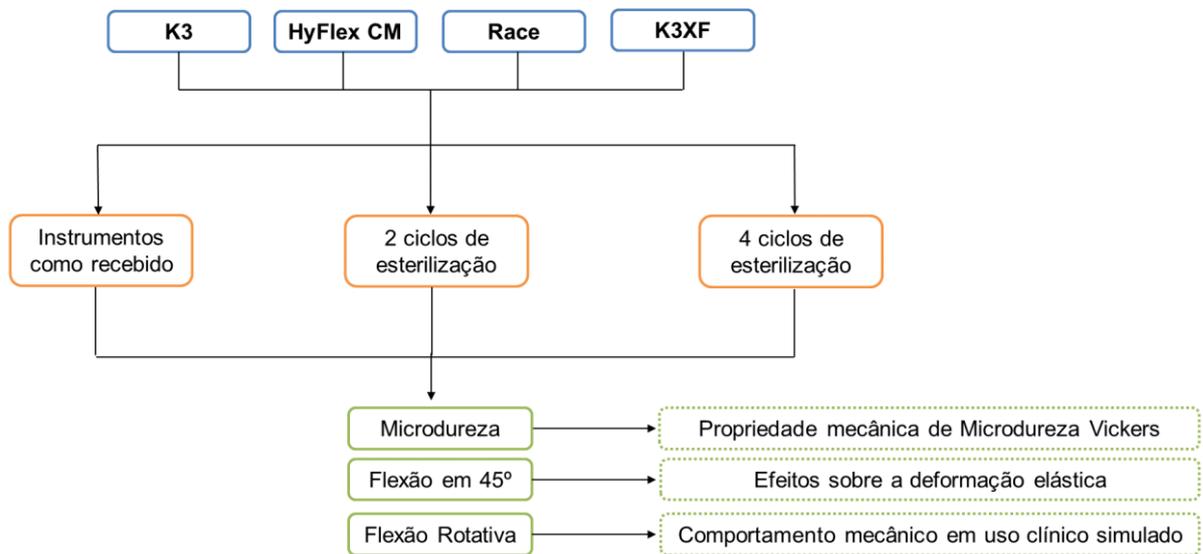
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, utilizou-se o software IBM® SPSS® Statistics versão 21. Inicialmente, foi realizada uma análise de *outliers* para retirada de valores atípicos. Em seguida, os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Quando a distribuição se mostrou não normal, adotou-se teste de Kruskal-Wallis. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de análise de variância (*one-way* ANOVA), e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK), quando houve homogeneidade de variância, e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunnett T3, quando houve heterogeneidade de variância. O nível de significância de todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

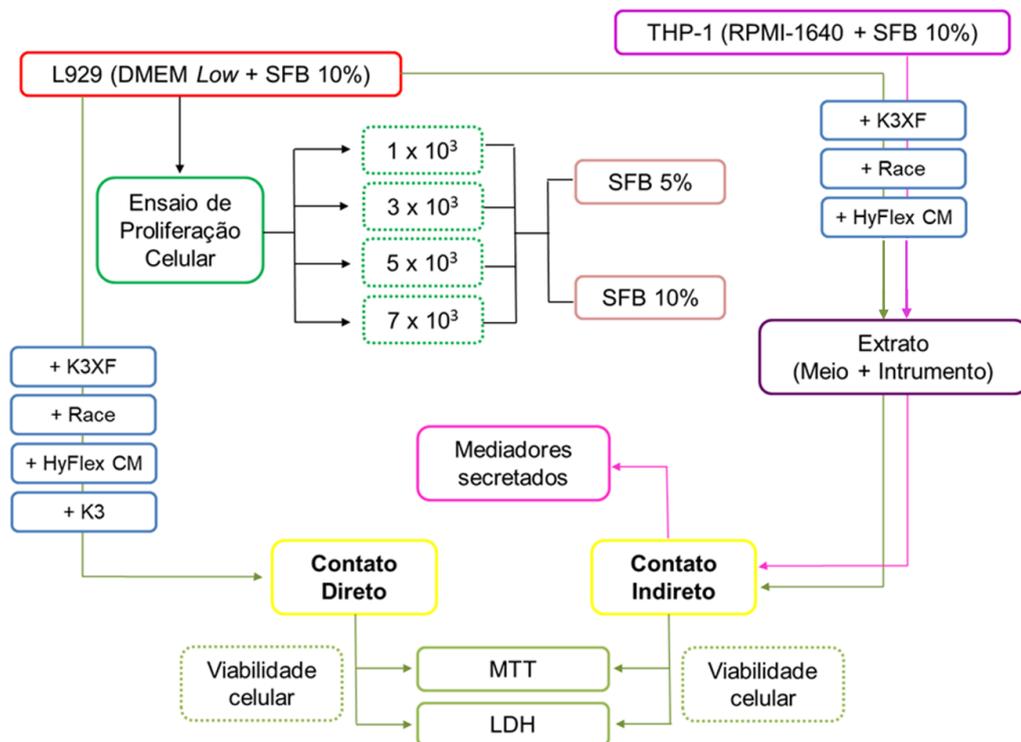
5.8 ORGANOGRAMA DE CARACTERIZAÇÃO



5.9 ORGANOGRAMA DE ENSAIOS MECÂNICOS



5.10 ORGANOGRAMA DE ENSAIOS BIOLÓGICOS



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO

6.1.1 Análise Morfométrica

A análise morfométrica permitiu avaliar os diâmetros e conicidade dos instrumentos. As informações sobre a precisão dimensional puderam ser confrontadas com as especificações de fabricação. A Figura 14 mostra os diâmetros reais do instrumento RaCe obtidos a partir de retas tangentes às cristas superiores e inferiores da haste helicoidal cônica, observados através da lupa binocular estereoscópica Opticam®.

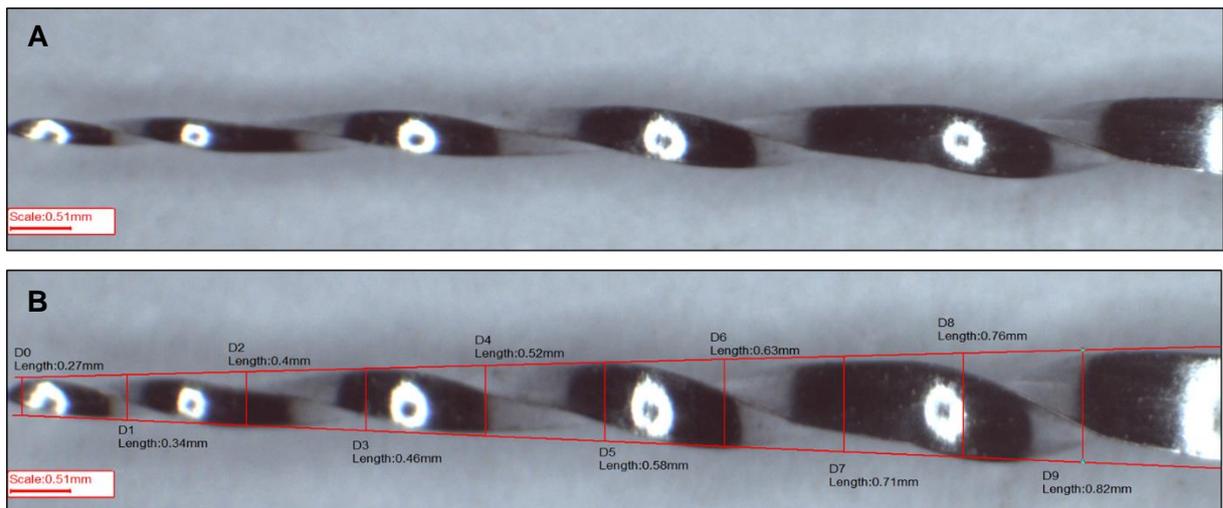


Figura 14. Microscopia óptica do instrumento RaCe, escala de 0,51mm. Em A, o instrumento antes da medição dos diferentes diâmetros. Em B, observou-se as medidas obtidas pelas retas tangentes (linhas vermelhas) às cristas superiores e inferiores da parte ativa dos mesmos

A dimensão D0 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 permitem determinar o diâmetro de trabalho em cada segmento do canal (Vieira *et al.*, 2011). À exemplo da Figura 14, dez instrumentos de cada marca comercial foram igualmente mensurados para que se pudesse determinar a conicidade, e os dados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores médios de diâmetro para os diferentes instrumentos e respectivas conicidades

	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Conicidade
K3											
Média	0,27	0,33	0,39	0,46	0,52	0,58	0,64	0,71	0,77	0,84	0,06
Desvio	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00
CV (%)	0,05	0,05	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06
HyFlex CM											
Média	0,24	0,29	0,36	0,42	0,48	0,54	0,60	0,67	0,74	0,79	0,06
Desvio	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00
CV (%)	0,06	0,06	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05
RaCe											
Média	0,27	0,34	0,41	0,48	0,54	0,60	0,66	0,72	0,78	0,85	0,06
Desvio	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01
CV (%)	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,12
K3XF											
Média	0,25	0,30	0,37	0,43	0,49	0,55	0,61	0,68	0,74	0,80	0,06
Desvio	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00
CV (%)	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

A morfometria revelou que os instrumentos atendem a recomendação da norma ANSI/ADA nº101, 2001. A base da ponta respeitou o limite de até +0,025 e a conicidade, o limite de até + 0,01. O instrumento de maior precisão de fabricação foi o K3XF, com D0 e conicidade idênticos aos nominais.

6.1.2 Difração de Raio X

O estudo por DRX permitiu determinar o tipo de estrutura cristalina, o que possibilitou entender o comportamento mecânico das ligas após as ciclagens térmicas, uma vez que as propriedades dos metais são ditadas principalmente pela estrutura em retículo cristalino e pela força de ligação (Pires *et al.*, 2015).

Para os instrumentos do estudo, a difração de raio X não revelou diferenças entre RaCe e K3, que apresentaram estrutura cristalina austenítica, como observado na

Figura 15 e Tabela 6. O instrumento Hyflex CM apresentou coexistência de fases austenita e martensita (Figura 16), enquanto que o instrumento K3XF apresentou coexistência de austenita e fase-R (Figura 17). Alguns estudos apontam diferenças nas propriedades mecânicas dos instrumentos (Lopes *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013), porém nenhum demonstrou efetivamente a presença delas utilizando uma técnica experimental. Após a esterilização as fases se mostraram estáveis, não havendo diferenças nos difratogramas dos instrumentos como recebido, e autoclavados duas e quatro vezes.

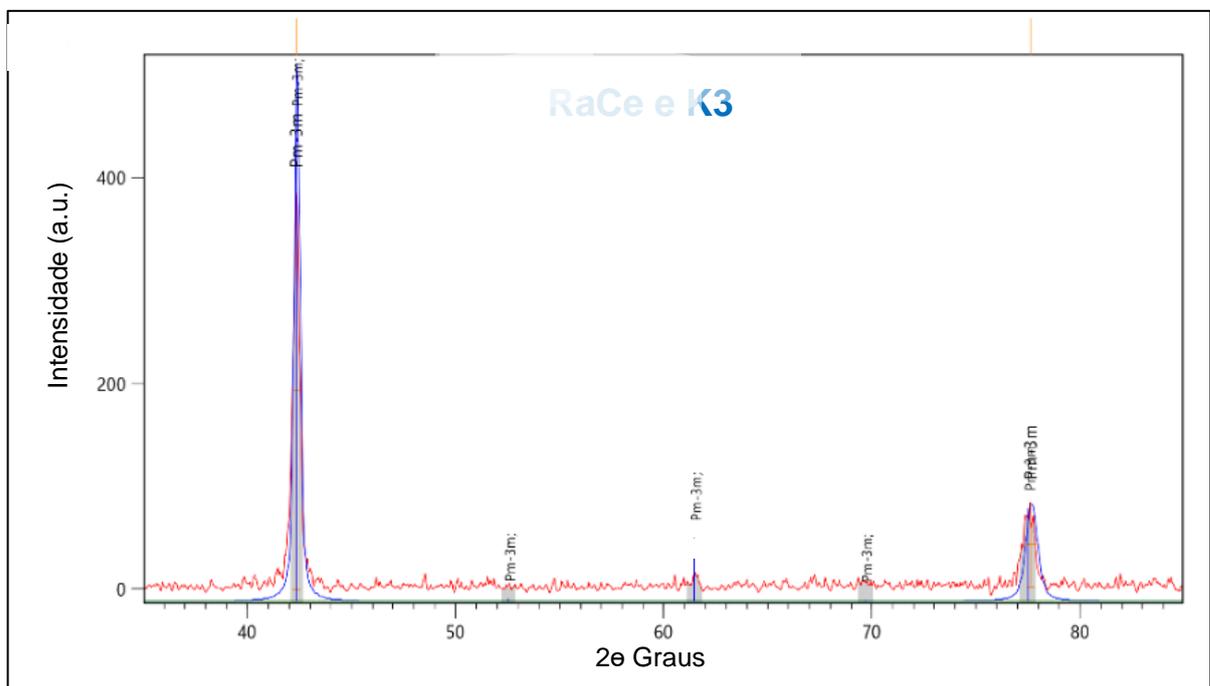


Figura 15. Difratograma de raio X dos instrumentos RaCe e K3

Tabela 6. Grupo espacial, sistema cristalino e fases dos instrumentos, por DRX

Instrumento	Grupo espacial	Sistema cristalino	Fase
RaCe e K3	Pm-3m	Cúbica	Austenita
HyFlex CM	Pm-3m e P2 ₁ /m	Cúbica e monoclinica	Austenita e Martensita
K3XF	Pm-3m e R3	Cúbica e romboédrica	Austenita e R

(Callister Jr, 2002)

6.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por MEV foi realizada nos instrumentos como recebidos a fim de verificar o acabamento de superfície, aresta lateral de corte (Figura 18), morfologia dos instrumentos (Figura 19), e possíveis defeitos existentes que pudessem influenciar os resultados dos ensaios mecânicos. A análise qualitativa das imagens permitiu observar que as marcas comerciais possuem acabamentos diferentes, sendo possível qualificá-los de melhor para pior na seguinte ordem: RaCe, HyFlex CM, K3 e K3XF.

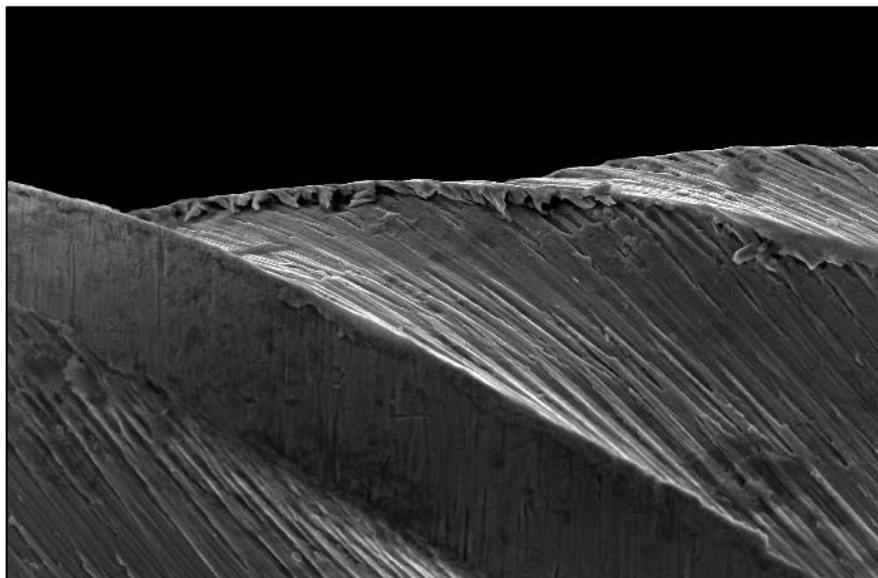


Figura 18. Aresta lateral de corte do instrumento K3 (Aumento de 400x)

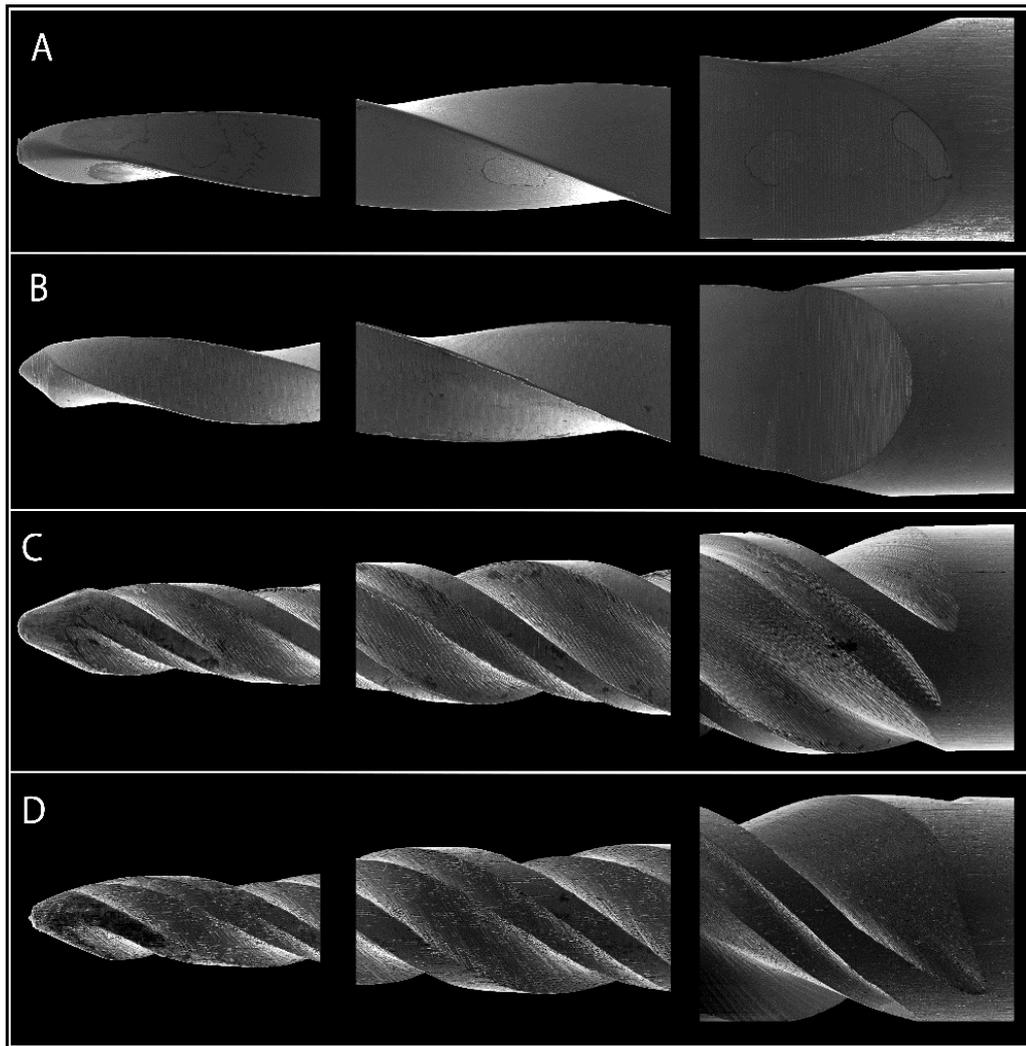


Figura 19. Geometria da ponta, porção média da parte ativa e interseção com o intermediário (D16) dos instrumentos RaCe (A), HyFlex CM (B), K3 (C) e K3XF (D), em aumento de 150x

Os instrumentos K3 apresentaram muitas marcas de usinagem e os instrumentos do tipo K3XF exibiram inúmeras microcavidades em seu acabamento (Figura 20). Estas microcavidades podem estar relacionadas ao maior teor de Níquel na liga, que forma precipitados de 2ª fase incoerente. O aumento de precipitados ricos em Ni, é esperado nos instrumentos K3XF, pois a sua aglomeração favorece a formação de fase-R por gerar maior campo de concentração de tensão na rede cristalina, aprisionando a martensita romboédrica. Em contrapartida, os instrumentos RaCe apresentaram superfície de acabamento mais homogênea, o que já é esperado em função do tratamento eletroquímico que recebe durante a fabricação, a fim de reduzir ranhuras advindas do processo. Todos os instrumentos apresentaram fratura do tipo dúctil, corroborando com outros trabalhos (Lopes *et al.*, 2010; 2011; 2013; Rodrigues *et al.*, 2011; Vieira, 2013).

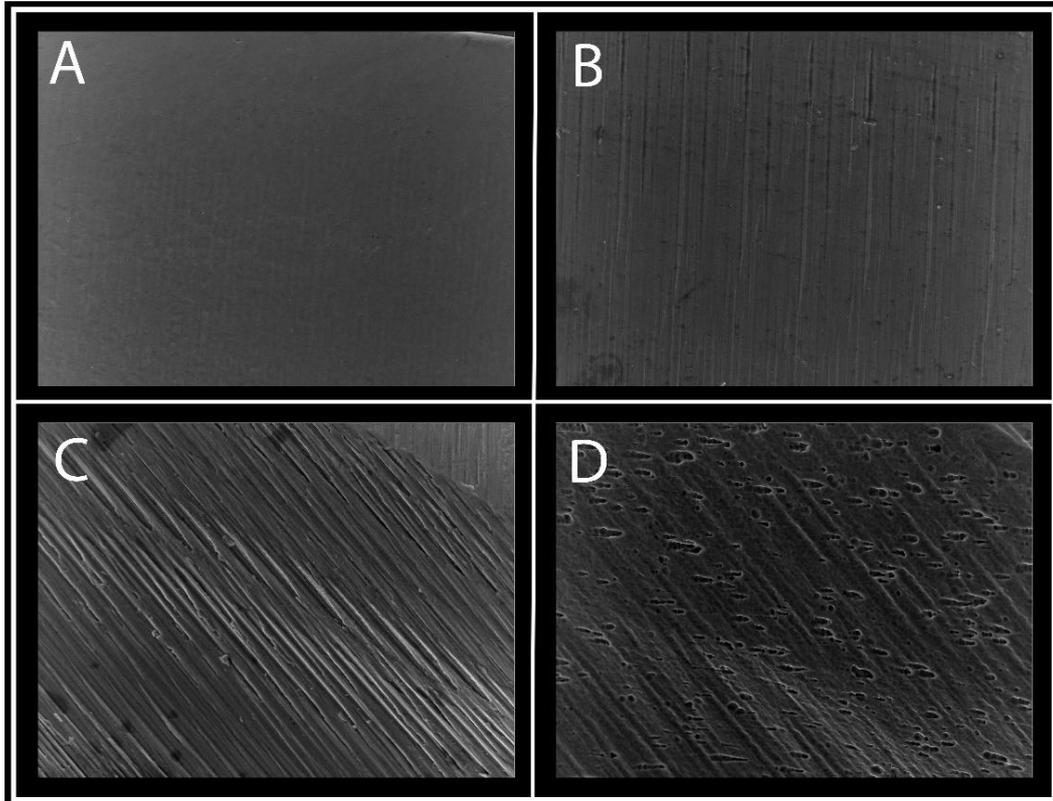


Figura 20. Superfície de acabamento dos instrumentos RaCe (A), HyFlex CM (B), K3 (C) e K3XF (D), em magnificação de 500x

6.2 ENSAIOS MECÂNICOS

6.2.1 Microdureza Vickers

O ensaio de microdureza Vickers foi realizado nos instrumentos como recebidos e após o processo de ciclagem térmica, a fim de verificar possíveis alterações na microestrutura que pudessem refletir na resposta mecânica dos materiais quando solicitados.

Os resultados dos grupos ensaiados estão expostos na Tabela 7 e foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk constatando-se a normalidade dos dados, e por esta razão, complementados com o teste ANOVA com nível de significância em 5%.

Tabela 7. Microdureza Vickers de instrumentos como recebido e após ciclagem térmica

μHV	Recebido (μHV)	2 autoclavagens (μHV)	4 autoclavagens (μHV)
K3	362 \pm 27,32 ^{Aa}	357 \pm 24,12 ^{Aa}	360,34 \pm 25,51 ^{Aa}
HyFlex CM	345 \pm 15,42 ^{Aa}	350 \pm 17,21 ^{Aa}	351,3 \pm 15,67 ^{Aa}
RaCe	348,6 \pm 23,92 ^{Aa}	332 \pm 21,73 ^{Aa}	351,7 \pm 22,45 ^{Aa}
K3XF	272,4 \pm 31,60 ^{Ab}	281,3 \pm 32,21 ^{Ab}	280,72 \pm 31,84 ^{Ab}

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os grupos de esterilização cíclica ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

A microdureza Vickers não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos testados (K3 $p=0,907$, Hyflex CM $p=0,658$, RaCe $p=0,133$, e K3XF $p=0,785$). Isto ocorreu devido algumas variáveis de interferência do processo de caracterização, como embutimento e lixamento do material, uma vez que a inclusão em resina acrílica envolve uma reação de polimerização exotérmica e o ato de lixar o instrumento pode gerar martensita pelo processo de transformação martensítica induzida por tensão (Thompson, 2000). Apesar destas possíveis modificações microestruturais, foi detectada uma menor dureza da liga do instrumento K3XF em relação aos outros instrumentos ($p < 0,05$), isto ocorreu devido à dominância da fase-R na liga. Os ciclos de autoclavagem não influenciaram na microdureza Vickers das ligas dos instrumentos ($p > 0,05$).

6.2.2 Flexão em 45°

O ensaio de flexão em 45° teve como objetivo a avaliação dos efeitos sobre a deformação elástica sofrida pelos diferentes instrumentos após a ciclagem térmica, uma vez que a flexibilidade pode influenciar a vida do instrumento em fadiga e a capacidade do instrumento modelar adequadamente em canais curvos com segurança.

Os resultados foram registrados em força (gf) e podem ser observados na Tabela 8. Para o tratamento dos dados, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado em todos os grupos ensaiados, demonstrando distribuição normal. Portanto o teste de

hipótese adotado foi paramétrico (ANOVA), com nível de significância ajustado em 5% e complementado pelo teste de comparações múltiplas de SNK com nível de significância em 5%.

Tabela 8. Valores de força (gf) determinados pelo ensaio de flexão em 45°

Instrumento	Recebido (gf)	2 autoclavagens (gf)	4 autoclavagens (gf)
K3	630,26 ± 32,45 ^{Aa}	684,71 ± 18,03 ^{Ba}	684,24 ± 33,46 ^{Ba}
HyFlex CM	216,92 ± 17,63 ^{Ab}	244,87 ± 21,24 ^{Bb}	233,85 ± 18,14 ^{Bb}
RaCe	455,35 ± 18,23 ^{Ac}	491,64 ± 17,98 ^{Bc}	503,82 ± 15 ^{Bc}
K3XF	426,90 ± 15,46 ^{Ad}	447,40 ± 11,90 ^{Bd}	471,21 ± 17,45 ^{Cd}

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os grupos de esterilização cíclica ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

O ensaio demonstrou que houve diferença entre os valores de força relatados para os instrumentos não autoclavados. Isto ocorreu devido às diferenças na geometria da secção reta transversal, que influencia o seu desenho (Figura 19), e às diferenças na estrutura cristalina (Tabela 6). Os instrumentos apresentaram a seguinte ordem do mais flexível para o menos flexível: HyFlex CM > K3XF > RaCe > K3. HyFlex CM mostrou maior flexibilidade devido à predominância de martensita na sua composição, pois possui menor módulo de elasticidade em comparação com austenita (Thompson, 2000, Sousa *et al.*, 2015), proporcionando menor rigidez. O instrumento K3XF apresenta a fase-R, ou romboédrica, que possui um módulo de elasticidade menor que o da martensita (Vieira *et al.*, 2011), porém devido à geometria do instrumento, e à tecnologia CM de HyFlex CM, o mesmo mostrou ser menos flexível. Os instrumentos RaCe e K3 apresentaram a austenita como principal fase, o que confere uma maior rigidez, em função do arranjo cristalino cúbico de corpo centrado. O instrumento K3 foi ainda mais rígido que RaCe devido sua geometria com maior número de hélices e maior robustez.

Embora Casper *et al.* tenha publicado um estudo em 2011 mostrando que a ciclagem térmica de alguns instrumentos de NiTi não seria capaz de alterar a deformação sob tensão e a resistência à fratura, neste estudo, foi possível perceber que os ciclos de autoclavagens tornaram os todos os instrumentos menos flexíveis,

sendo RaCe e K3 os mais rígidos. Isto pode ter ocorrido devido a presença de alguma fração martensítica residual oriunda do processo de usinagem no momento da fabricação que, quando submetida ao calor da esterilização facilita à recuperação da fase matriz austenítica. Os instrumentos HyFlex CM se tornaram mais rígidos pelo mesmo motivo. Para estes três instrumentos, as modificações ocorreram logo após o segundo ciclo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre 2 e 4 ciclos de autoclavagem ($p > 0,05$). O instrumento K3XF apresentou aumento significativo da rigidez, sobretudo quando submetido ao maior número de autoclavagens. Isto pode ter ocorrido porque a fase-R, sendo uma martensita metaestável, é desfavorecida durante o processo de aquecimento. Outro fator a ser considerado é o número de partículas na composição do material, sugerindo a necessidade de estudos de quantificação da fração de fases nos instrumentos para corroborar com os achados.

6.2.3 Flexão Rotativa

O ensaio de flexão rotativa foi adotado a fim de observar o comportamento mecânico dos instrumentos quando solicitados no uso clínico e os impactos sobre as propriedades mecânicas após ciclagem térmica. Para isso, um aparato confeccionado em aço e embutido em resina foi utilizado para simular o canal (Figura 8). Os valores referentes ao número de ciclos necessário para a fratura dos diferentes instrumentos são mostrados na Tabela 9 e apresentaram-se normais segundo o teste de Kormolgorov-Smirnov. Os NCFs dos instrumentos esterilizados foram comparados através do teste ANOVA complementado com o teste SNK, ambos com nível de significância em 5%.

Tabela 9. Número de ciclos para fratura (NCF) dos instrumentos endodônticos

Instrumento	Recebido (NCF)	2 autoclavagens (NCF)	4 autoclavagens (NCF)
K3	207 ± 17,80 ^{Aa}	349 ± 43,65 ^{Ba}	311 ± 16,73 ^{Ca}
HyFlex CM	714 ± 47,10 ^{Ab}	322 ± 64,67 ^{Ba}	272 ± 63,99 ^{Ba}
RaCe	132 ± 11,50 ^{Ac}	122 ± 17,50 ^{Ab}	99 ± 14,70 ^{Bb}
K3XF	291 ± 31,50 ^{Ad}	473 ± 21,39 ^{Bc}	306 ± 78,05 ^{Aa}

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os grupos de esterilização cíclica ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

Os resultados apontaram comportamento diferente do observado no ensaio de flexão em 45° mesmo para instrumentos não autoclavados, e apresentaram a seguinte ordem, do maior para o menor tempo para fratura: HyFlex CM > K3XF > K3 > RaCe. O fator dominante para a maior vida em fadiga observado nos instrumentos do tipo HyFlex CM, pode ser atribuída a alta flexibilidade proporcionada pela fase martensítica do material, uma vez que quanto maior a flexibilidade, menor a intensidade de tensão no interior do canal simulado, o que terá consequências na nucleação e propagação das trincas.

Teoricamente, devido sua estrutura cristalina, o instrumento K3XF deveria ter uma maior vida em fadiga em relação ao HyFlex CM, porém isto não ocorreu devido sua geometria (que a torna mais rígida) e ao seu acabamento superficial. O acabamento superficial possui influência na fadiga, pois os defeitos funcionam como concentradores de tensão (Lopes *et al.*, 2011). Comparando instrumentos de mesma geometria e morfologias diferentes, os instrumentos K3XF possuem uma vida 28,87% maior que os K3, e os HyFlex CM, 81,5% maior que a RaCe. Uma solução para melhorar a vida em fadiga dos instrumentos como recebido é sugerido no estudo de Anderson e colaboradores, publicado em 2007, onde o grupo demonstra maior resistência à fratura em instrumentos eletropolidos, por reduzir significativamente irregularidades superficiais que poderiam atuar como pontos concentradores de tensão e propagadores de fissuras (Anderson *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2010).

Quando submetidos aos ciclos de autoclavagem os instrumentos apresentaram comportamentos heterogêneos. Isto ocorre, porque a autoclavagem sucessiva provoca modificações no tratamento térmico adotado pelo fabricante, em alguns

casos, reduzindo a vida útil do instrumento em fadiga, como nos casos dos instrumentos do tipo HyFlex CM e RaCe. Por este motivo os fabricantes dos instrumentos mais atuais recomendam o uso único dos instrumentos. Em relação a esse aspecto uma atenção deve ser dada ao instrumento HyFlex CM, pois fabricante recomenda a esterilização para recuperação da forma do material, quando os resultados deste estudo apontam para uma redução de até 62% da vida útil em fadiga após a ciclagem térmica.

6.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.3.1 Ensaio de Proliferação Celular

O ensaio de proliferação celular constituiu importante etapa precursora dos experimentos de viabilidade, e teve como objetivo avaliar o comportamento da cultura ao longo dos tempos em que seriam reproduzidos os testes via Contato Direto. Isto se fez necessário porque a ISO 10993:5/2009 preconiza a análise da viabilidade com 24h de exposição das células ao dispositivo-teste e, um dos objetivos deste trabalho foi extrapolar este tempo com análises de 24h, 7, 15 e 30 dias por acreditar que parte da toxicidade poderia estar relacionada à liberação de íons metálicos diante da exposição prolongada. Desta forma, a quantidade inicial de células, assim como a quantidade de suplementação do meio DMEM *Low* com SFB, poderiam garantir ou condenar a viabilidade celular no decorrer dos diferentes tempos de experimento, sugerindo resultados não fidedignos.

Para isto, utilizou-se placas de 24 poços e empregou-se concentrações iniciais diferentes de células/ poço: 1×10^3 , 3×10^3 , 5×10^3 e 7×10^3 , variando a concentração fornecida de suplemento.

A Figura 21 mostra o perfil de crescimento da população das células L929, através da absorbância em função do tempo. Com a leitura realizada em 7 dias, observa-se um crescimento exponencial para todas as concentrações iniciais, o que é esperado, uma vez que o meio conta com pequeno volume de células, espaço físico livre e nutrientes em abundância.

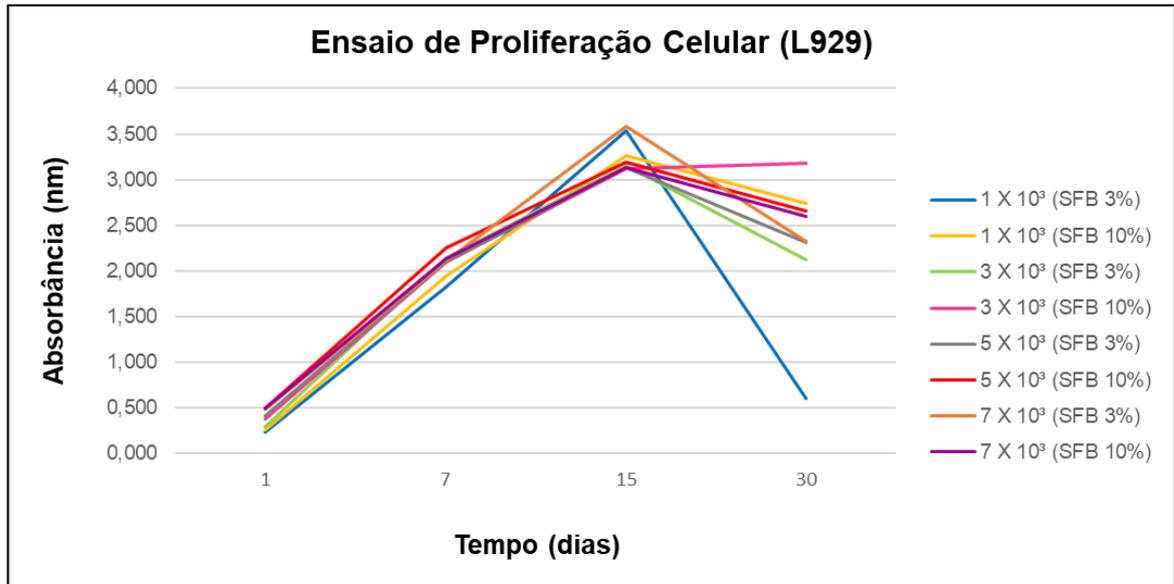


Figura 21. Proliferação de células L929 ao longo do tempo

Ao 15º dia, todas as concentrações atingem um platô na taxa de proliferação, porém com diferenças particulares: as menores concentrações iniciais, 1×10^3 SFB3% e 10%, atingiram maiores populações celulares, enquanto as concentrações iniciais maiores se mantiveram mais homogêneas. A explosão metabólica das baixas concentrações foi inversamente proporcional à capacidade de manutenção da cultura em longos tempos de experimento, defasando rapidamente o espaço físico e os nutrientes da suplementação.

Com 30 dias de experimento, a concentração 1×10^3 SFB3% apresenta a menor viabilidade entre as concentrações, com apenas 17% de células vivas em relação ao volume celular apresentado em 15 dias. As demais concentrações começam a apresentar declínio na viabilidade, seja por escassez de nutrientes, ou por inibição do crescimento por contato, onde o glicocálix emite sinais químicos que interrompem a mitose.

A concentração inicial de 3×10^3 SFB10% manteve o crescimento regular ao longo dos diferentes tempos e mesmo ao 30º dia apresentou-se satisfatoriamente viável, o que demonstra que o crescimento homogêneo combinado à maior taxa de suplementação foi suficiente para o crescimento e manutenção da cultura. Embora esta tenha sido a concentração inicial escolhida para realização do ensaio via Contato Direto, não é possível garantir o perfil ascendente desta concentração inicial em tempos maiores de estudo.

6.3.2 Integridade da Monocamada

Além do volume inicial de células a ser empregado no ensaio por Contato Direto, outra preocupação inicial da metodologia dos ensaios biológicos envolveu a possibilidade de o instrumento fragmentar a monocamada celular em função da sua morfologia e, sobretudo, pela presença das arestas de corte na porção ativa que, ao menor movimento, poderiam comprometer a integridade da cultura. Por esta razão, utilizou-se uma cultura sob as mesmas condições de cultivo empregadas no ensaio de citotoxicidade, onde as células foram cultivadas em contato com os instrumentos por 15 dias e observadas ao microscópio óptico.

A Figura 22A mostra o poço contendo células somente com DMEM *Low* + SFB10%, enquanto 22B mostra as células em Contato Direto com o instrumento. Ambas as imagens foram obtidas em magnificação de 10x, e mostram que o instrumento não proporcionou rompimento da monocamada ou dano físico até este período.

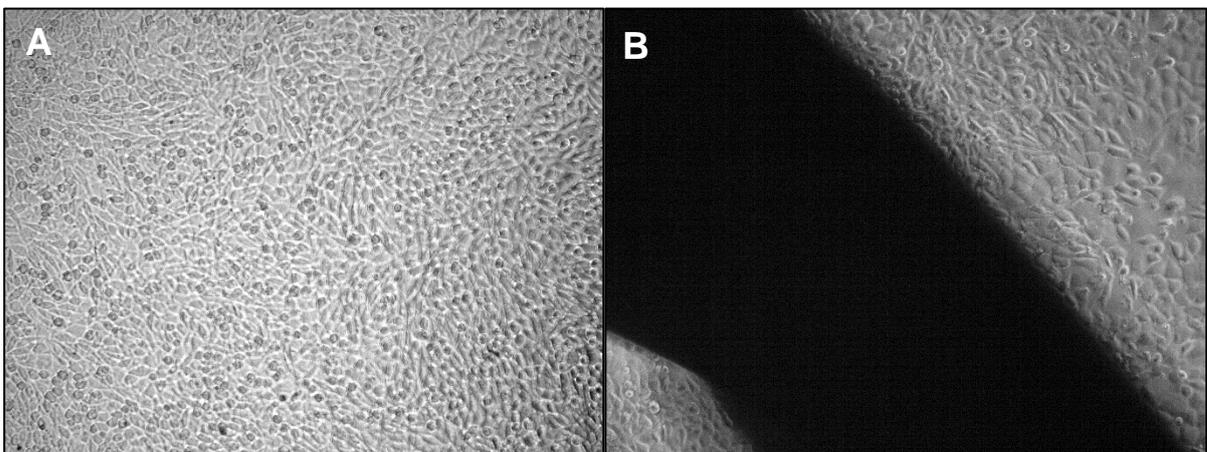


Figura 22. Avaliação da integridade da monocamada durante teste preliminar por Contato Direto (10x). Em A, células sem a inclusão do fragmento do instrumento, após 15 dias de cultivo. Em B, células em Contato Direto com o instrumento durante 15 dias

6.3.3 MTT Via Contato Direto

No ensaio colorimétrico utilizando MTT, a biorredução do composto MTT em um produto cromogênico, a formazana, ocorre por ação de desidrogenases mitocondriais, revelando a viabilidade das células por uma relação direta da atividade mitocondrial

(Mosmann, 1983). É importante que esta atividade possa ser analisada ao decorrer de tempos prolongados de exposição ao material testado, uma vez que o fragmento do instrumento, quando não removido do interior do canal, se torna residente por tempo indeterminado. Por esta razão, as leituras das placas foram realizadas em 1, 7, 15 e 30 dias para ensaios via Contato Direto, garantindo a observação do comportamento das células em exposição ao instrumento pelo máximo de tempo capaz de assegurar a manutenção da cultura. Logo, diferente dos tempos maiores adotados para os ensaios de Contato Indireto, a metodologia proposta demonstra a limitação da manutenção da cultura por 60 e 90 dias, pois poderia apontar para resultados sugestivos de falso-positivo para citotoxicidade, em função da fase de declínio do crescimento celular pela inibição da proliferação por contato.

A Figura 23 mostra a viabilidade das células L929 ao longo do tempo, onde se observa claramente que o dia 1 apresenta menor viabilidade em todas as amostras, incluindo o Ctrl-, quando comparado aos demais tempos. Isto ocorre porque 24 horas após o plaqueamento da concentração inicial de células (3×10^3 células/poço), a cultura encontra-se em subconfluência mas não atingiu o platô de crescimento e, portanto, pode apresentar-se em fase de latência. Entretanto, podemos observar na Tabela 10 que, quando comparado o perfil de crescimento celular entre os instrumentos e o Ctrl- para o mesmo período, 1 dia, as limas do tipo HyFlex CM e K3 demonstraram significativa redução da viabilidade celular, sugerindo um possível efeito citostático ou citotóxico sobre a linhagem L929 diante de uma exposição aguda aos instrumentos. Estes resultados se tornam ainda mais relevantes quando consideramos que ambos os instrumentos se tornaram mais rígidos após a ciclagem térmica e que HyFlex CM teve sua vida em fadiga reduzida após os ciclos de esterilização, pois a susceptibilidade de fratura do instrumento aliada ao curto período de exposição à liga metálica já poderia gerar ao paciente riscos pela permanência do fragmento em contato com células residentes do ligamento periodontal.

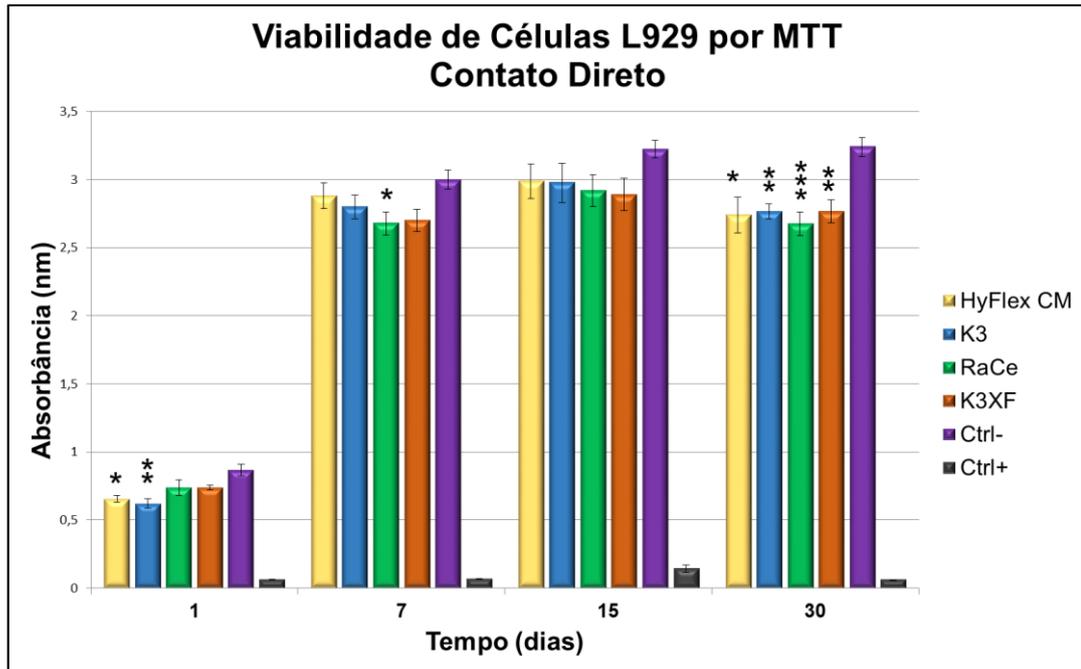


Figura 23. Viabilidade de células L929, por MTT, via Contato Direto. O Ctrl- representa o controle negativo de morte e Ctrl+ é o controle positivo de morte. Teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações em relação ao respectivo grupo controle negativo de morte (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Tabela 10: Valores percentuais médios de absorbância em relação à média de Ctrl- (1, 7, 15 e 30 dias), por ensaio de MTT, via Contato Direto

	HyFlex CM	K3	RaCe	K3XF	Ctrl-	Ctrl+
1 dia						
Média (DP)	20,76 ^{Aa} (3,20)	19,64 ^{Aa} (4,70)	23,41 ^{ABa} (7,57)	23,39 ^{ABa} (2,05)	27,57 ^{Ba} (7,36)	1,97 ^{Ca} (0,45)
7 dias						
Média (DP)	91,32 ^{ABb} (12,71)	88,76 ^{ABb} (11,94)	84,95 ^{Ab} (10,14)	85,57 ^{ABb} (10,92)	95,12 ^{Bb} (13,26)	2,12 ^{Cab} (0,26)
15 dias						
Média (DP)	94,79 ^{Ab} (13,83)	94,35 ^{Ab} (15,58)	92,58 ^{Ab} (12,76)	91,65 ^{Ab} (13,10)	102,19 ^{Ab} (10,10)	4,49 ^{Bb} (3,93)
30 dias						
Média (DP)	86,90 ^{Ab} (17,25)	87,69 ^{Ab} (7,42)	84,78 ^{Ab} (11,78)	87,71 ^{Ab} (10,80)	102,69 ^{Bb} (12,24)	1,93 ^{Ca} (0,22)

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tempos para um mesmo instrumento ($p < 0,05$)

Em função do platô de crescimento celular ocorrer por volta do 7^o dia, os valores percentuais médios de absorvância, observados na Tabela 10, foram indexados pela média de valores obtidos para os Ctrl- nos tempos 7, 15 e 30 dias. Com isso, buscou-se melhor compreensão dos fenômenos de viabilidade celular, minimizando a tendência de redução da média de viabilidade que ocorreria com a inclusão do Ctrl- em 24h na indexação.

Ainda considerando a Figura 23 e a Tabela 10, o instrumento HyFlex CM demonstrou diferença estatística na viabilidade celular quando observados os valores para 1 *versus* 7 dias, 1 *versus* 15 dias e 1 *versus* 30 dias. Entretanto os resultados entre 7, 15 e 30 dias não apresentaram diferença estatística, e este fenômeno se repetiu para todos os instrumentos. Contudo, comparando-se ao Ctrl-, os quatro instrumentos apresentaram redução da viabilidade em 30 dias, sugerindo que a exposição prolongada das células L929 aos diferentes instrumentos teria relação direta com o declínio de atividade mitocondrial.

6.3.4 Liberação de LDH Via Contato Direto

O teste de LDH é um ensaio enzimático direto, sendo considerado marcador da integridade da membrana plasmática. Isto porque a enzima lactato desidrogenase está presente em todo citoplasma celular e, quando a membrana plasmática é danificada, a enzima pode ser detectada no meio externo, devido à redução do sal Tetrazoluim, que é catalisado, gerando 2-(4-Iodonitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-tetrazoluim cloro e formazana. Desta forma, quando maior a intensidade de absorvância obtida através do ensaio, maior o volume enzimático encontrado em meio extracelular, e menor a viabilidade da cultura.

O estudo de liberação de LDH via Contato Direto foi conduzido após 1, 7, 15 e 30 dias de exposição da cultura ao instrumento, tal qual o MTT via Contato Direto, permitindo observar o comportamento da cultura em uma exposição aguda e crônica. Os resultados, expostos na Figura 24, mostram que a toxicidade por exposição aguda, sugerida pelo ensaio de MTT com 1 dia de Contato Direto, não foi observada por esta técnica para o mesmo período. Isto pode indicar que a redução na viabilidade celular observada por MTT não representou um evento citotóxico, mas sim, um efeito

citostático produzido pela liga NiTi convencional contida em K3 e martensítica de HyFlex CM.

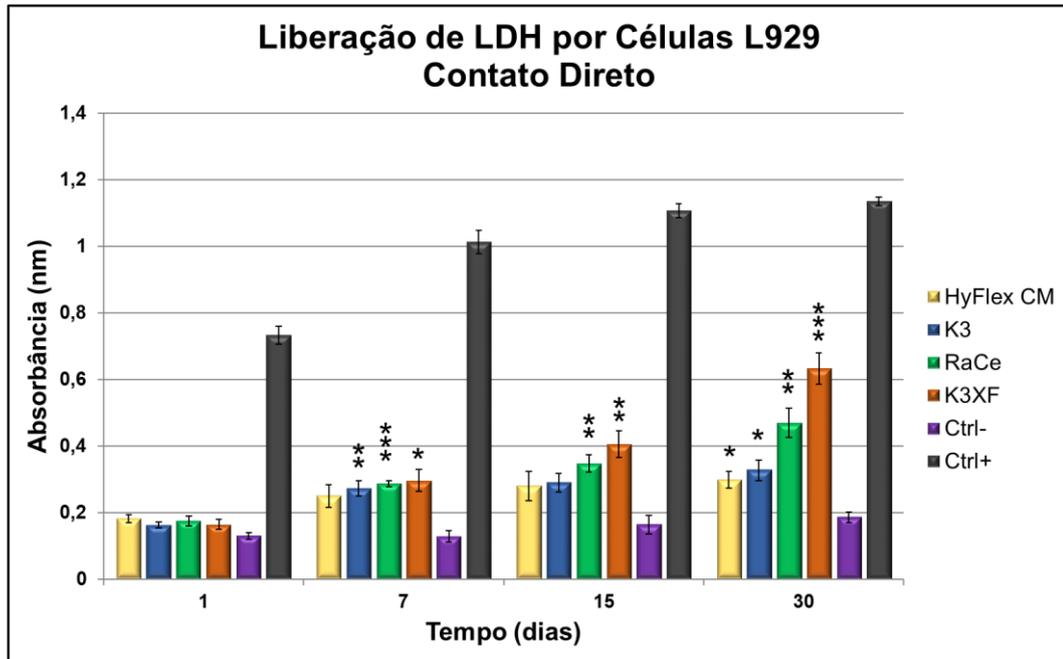


Figura 24. Liberação de LDH por células L929, via Contato Direto. O Ctrl- representa o controle negativo de morte e Ctrl+ é o controle positivo de morte. Teste *one-way* ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett T3 em relação ao respectivo grupo controle negativo de morte (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Em contrapartida, com 30 dias de Contato Direto, os sobrenadantes coletados de todos os instrumentos apresentaram quantidade significativamente maior de LDH que o controle negativo de morte, indicando redução na viabilidade celular, e isto pode ser observado na Tabela 11, através dos valores percentuais médios de absorbância indexados à média obtida para os controles positivos de morte, obtidos em 7, 15 e 30 dias. Embora todos os instrumentos tenham se mostrado nocivos à linhagem celular, com redução de viabilidade em 26,29% para os instrumentos HyFlex CM e 41,39% para os instrumentos RaCe, K3XF chama atenção por reduzir a população de células em cerca de 55,76%. Vale ressaltar que este instrumento é uma versão mais recente de K3, cujo tratamento térmico permitiu a estabilização da liga metálica em fase-R, gerando um instrumento com mais flexibilidade que a liga NiTi convencional da K3. Entretanto, a citotoxicidade de K3XF se revelou maior que seu par, K3, que reduziu a viabilidade em 28,80%, e os ensaios mecânicos demonstraram aumento na sua

rigidez, além de redução da vida útil em fadiga, a partir de 2 ciclos de esterilização. Por esta razão, K3XF deve ser empregada com cautela na clínica endodôntica.

Tabela 11: Valores percentuais médios de absorvância em relação à média de Ctrl+ (1, 7, 15 e 30 dias), por ensaio de LDH, via Contato Direto

	HyFlex CM	K3	RaCe	K3XF	Ctrl-	Ctrl+
1 dia						
Média (DP)	16,67 ^{Aa} (2,70)	14,92 ^{Aa} (2,02)	16,13 ^{Aa} (3,39)	15,16 ^{Aa} (3,27)	11,95 ^{Aa} (2,97)	67,55 ^{Ba} (8,72)
7 dias						
Média (DP)	22,96 ^{ABa} (7,73)	25,13 ^{Ab} (5,03)	26,45 ^{Ab} (2,14)	27,32 ^{Ab} (7,38)	11,80 ^{Bab} (5,39)	93,36 ^{Cb} (11,28)
15 dias						
Média (DP)	25,85 ^{ABa} (9,98)	26,74 ^{ABb} (6,42)	31,97 ^{Abc} (5,89)	37,42 ^{Ab} (9,12)	15,04 ^{Bab} (8,96)	102,01 ^{Cbc} (6,48)
30 dias						
Média (DP)	27,50 ^{Ab} (5,52)	30,13 ^{Ab} (7,11)	43,30 ^{Abc} (9,85)	58,34 ^{Bc} (10,73)	17,04 ^{Cb} (5,07)	104,62 ^{Dc} (4,06)

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tempos para um mesmo instrumento ($p < 0,05$)

6.3.5 MTT Via Contato Indireto

Um dos processos de degradação de biomateriais ocorre por corrosão. A corrosão pode ser mais ou menos extensiva em função das propriedades físico-químicas do material, do meio em que se encontra, e da capacidade de interação entre os dois. Durante a corrosão, um material classificado como bioinerte do ponto de vista toxicológico, pode liberar íons que assume caráter tóxico para o meio (Morais *et al.*, 2007). Além disso, a forma de exposição, seja ela crônica ou aguda, pode sugerir perfis variáveis de toxicidade.

Se por um lado, o ensaio via Contato Direto permitiu avaliar o efeito da liga metálica sobre as células de forma aguda e crônica, até 30 dias, a técnica de citotoxicidade via Contato Indireto permitiu conhecer os efeitos diante de uma exposição aguda com extratos obtidos em diferentes tempos. Logo, espera-se que

quanto maior o tempo de permanência do instrumento com o meio do extrato, maior a tendência à corrosão e liberação de íons de Ni e Ti.

Ao Contato Direto, foi possível observar que com 1 dia de exposição da cultura aos instrumentos, HyFlex CM e K3 reduziram a viabilidade de células L929, sugerindo um efeito citostático e, com 30 dias, todos os instrumentos foram nocivos, sendo K3XF o de maior potencial citotóxico (Tabelas 10 e 11). Entretanto, a exposição aguda via Contato Indireto, observado na Figura 25, mostra que o declínio da viabilidade celular é progressivo a partir do 15º dia de experimento, chegando a uma redução de aproximada de 40% da atividade mitocondrial em células submetidas ao extrato com instrumento RaCe, 52% com HyFlex CM e 56% com K3XF, em 90 dias.

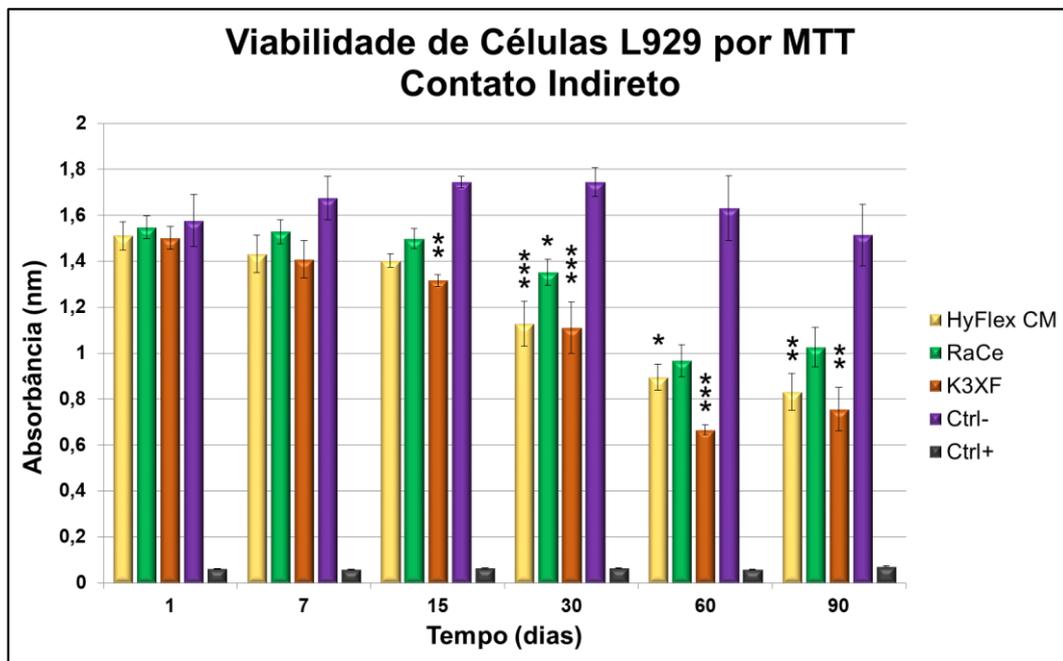


Figura 25. Viabilidade de células L929, por MTT, via Contato Indireto. O Ctrl- representa o controle negativo de morte e Ctrl+ é o controle positivo de morte. Teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações em relação ao respectivo grupo controle negativo de morte (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A Tabela 12 mostra a viabilidade de células L929, através dos valores percentuais médios de absorbância indexados à média obtida para os controles negativos de 7, 15 e 30 dias, assim como adotado para Contato Direto. O aumento do potencial citotóxico sobre a linhagem L929 progressivo pode sugerir que com tempos maiores, a liga metálica esteja mais susceptível ao processo de corrosão, liberando para o meio, íons metálicos de Ni e Ti (Moraes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011). Isto

também justificaria a maior toxicidade entre os instrumentos K3XF, pela precipitação de 2ª fase incoerente de Ni. Embora estudos apontem para bioinércia de Titânio, pouco se sabe sobre a atividade do Ni em diferentes células, Quadras e colaboradores, apontam para possíveis efeitos de hipersensibilidade, de citotoxicidade e genotoxicidade (Quadras *et al.*, 2018).

Tabela 12: Valores percentuais médios de absorvância em relação à média de Ctrl- (1, 7, 15 e 30 dias), por ensaio de MTT, via Contato Indireto

	HyFlex CM	RaCe	K3XF	Ctrl-	Ctrl+
1 dia					
Média (DP)	87,79 ^{Aa} (10,08)	89,91 ^{Aa} (8,21)	87,18 ^{Aa} (8,12)	91,61 ^{Aa} (18,48)	3,57 ^{Bab} (0,29)
7 dias					
Média (DP)	83,13 ^{Aab} (9,50)	88,78 ^{Aa} (6,18)	81,82 ^{Aac} (9,58)	97,26 ^{Aa} (10,87)	3,38 ^{Bab} (0,06)
15 dias					
Média (DP)	81,48 ^{ABab} (3,48)	87,04 ^{ABac} (4,96)	76,45 ^{Aab} (3,08)	101,37 ^{Ba} (2,81)	3,70 ^{Cab} (0,36)
30 dias					
Média (DP)	65,53 ^{Aab} (19,76)	78,58 ^{ABab} (11,40)	64,53 ^{Aab} (22,40)	101,37 ^{Ba} (12,53)	3,70 ^{Cab} (0,29)
60 dias					
Média (DP)	52,09 ^{Ab} (9,33)	56,23 ^{ACb} (11,45)	38,65 ^{Bb} (3,71)	94,70 ^{Ca} (23,09)	3,36 ^{Da} (0,21)
90 dias					
Média (DP)	48,30 ^{Ab} (13,12)	59,63 ^{ABbc} (14,25)	43,93 ^{Abc} (15,64)	87,92 ^{Ba} (21,92)	4,12 ^{Cb} (0,46)

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tempos para um mesmo instrumento ($p < 0,05$)

6.3.6 Liberação de LDH Via Contato Indireto

Assim como adotado no ensaio de MTT via Contato Indireto, a liberação de LDH foi realizada em culturas submetidas aos extratos obtidos em 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de contato dos instrumentos com meio de cultura. E, tal qual visto através do MTT via Contato Direto, os valores de absorvância obtidos pela liberação de LDH é crescente

para os extratos com maiores tempos, como pode ser observado na Figura 26. Isto corrobora com os resultados obtidos através do MTT via Contato Indireto, onde se pode perceber a redução de viabilidade celular progressiva entre as culturas o longo dos tempos, com ápice de efeito citotóxico em amostras tratadas com extratos de 90 dias.

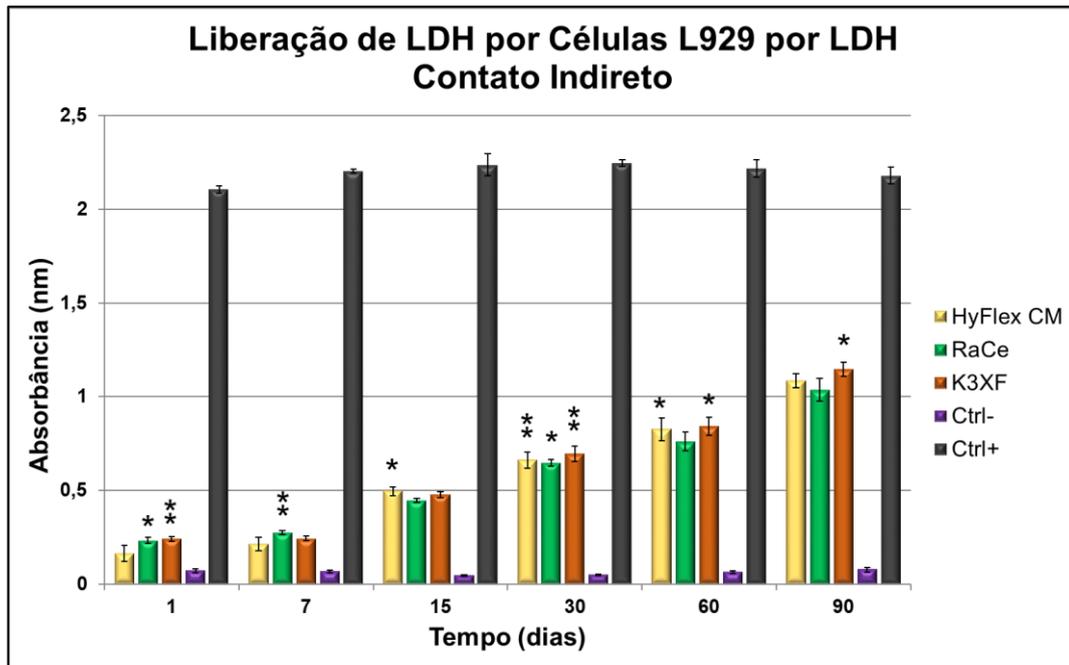


Figura 26. Liberação de LDH por células L929, via Contato Indireto. O Ctrl- representa o controle negativo de morte e Ctrl+ é o controle positivo de morte. Teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações em relação ao respectivo grupo controle negativo de morte (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A Tabela 13 é padronizada através dos valores percentuais médios de absorbância indexados à média obtida para os controles positivos de morte, em 7, 15 e 30 dias, e mostra considerável efeito sobre a viabilidade celular em 60 dias, onde Hyflex CM reduziu a população de células L929 em 37,25%, RaCe em 34,28%, e K3XF em 38%. Com extratos de 90 dias, o perfil de liberação de LDH se mantém, com redução da população celular em 49,77% para instrumentos HyFlex CM, 47,60% para instrumentos do tipo RaCe, e 52,60% para K3XF. Estes valores corroboram com os achados nos demais ensaios biológicos e apontam para a nocividade da permanência dos instrumentos endodônticos no interior do canal para fibroblastos.

Tabela 13: Valores percentuais médios de absorvência em relação à média de Ctrl+ (1, 7, 15 e 30 dias), por ensaio de LDH, via Contato Indireto

	HyFlex CM	RaCe	K3XF	Ctrl-	Ctrl+
1 dia					
Média (DP)	7,38 ^{ABa} (5,32)	10,42 ^{Aa} (1,92)	10,84 ^{Aa} (1,65)	3,12 ^{Ba} (1,39)	94,46 ^{Ca} (2,21)
7 dias					
Média (DP)	9,65 ^{ABac} (3,20)	12,33 ^{Aac} (0,85)	10,95 ^{ABac} (1,24)	3,02 ^{Ba} (0,82)	98,88 ^{Cab} (1,37)
15 dias					
Média (DP)	22,23 ^{Ab} (2,01)	20,05 ^{ABab} (1,05)	21,46 ^{ABab} (1,44)	2,03 ^{Ba} (0,28)	100,35 ^{Cab} (5,33)
30 dias					
Média (DP)	29,71 ^{Abc} (5,41)	29,03 ^{Abc} (2,09)	31,20 ^{Abc} (5,31)	2,22 ^{Ba} (0,32)	100,78 ^{Cb} (2,08)
60 dias					
Média (DP)	37,07 ^{Ab} (7,83)	34,12 ^{ABbc} (6,27)	37,82 ^{Ab} (6,11)	2,86 ^{Ba} (0,74)	99,53 ^{Cab} (4,27)
90 dias					
Média (DP)	48,67 ^{ABb} (3,35)	46,55 ^{ABb} (5,40)	51,44 ^{Ab} (3,27)	3,42 ^{Ba} (1,03)	97,79 ^{Cab} (3,96)

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tempos para um mesmo instrumento ($p < 0,05$)

6.3.7 Análise de Mediadores Secretados

Em função do alto custo associado à análise de mediadores secretados, foram selecionados somente os extratos, cuja exposição via Contato Indireto às células do tipo THP-1, apontaram nocividade: 15, 30, 60 e 90 dias. O Apêndice A deste trabalho traz os valores médios para as citocinas expressas para os diferentes instrumentos.

A Figura 27 mostra as principais citocinas secretadas após a exposição de células THP-1 aos extratos de diferentes instrumentos. Foram consideradas como principais citocinas aquelas de significância ao processo de injúria celular e cujos valores médios de secreção apontaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação à média do controle negativo de morte. Desta forma, observa-se a presença de 6 principais citocinas: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-13 (IL-

13), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Proteína Inflamatória de Macrófago (MIP-1 β).

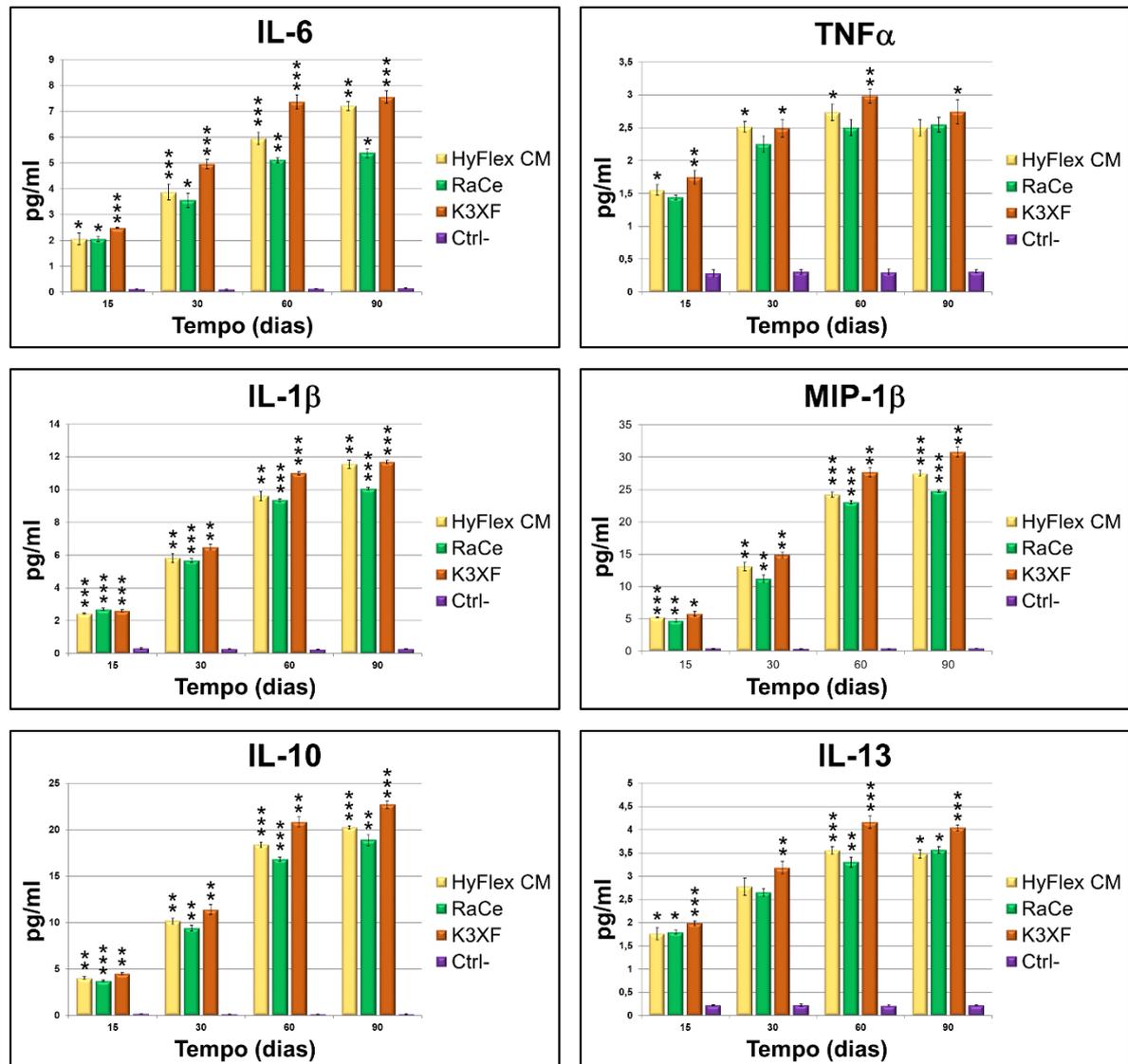


Figura 27. Principais citocinas secretadas por células THP-1 após Contato Indireto com extratos de 15, 30, 60 e 90 dias. O Ctrl- representa o controle negativo de morte. Teste de múltiplas comparações de Kruskal-Wallis (IL-6, TNF- α e IL-13) e teste *one-way* ANOVA com múltiplas comparações Dunnett T-3 (IL-1 β , MIP-1 β , IL-10) em relação ao respectivo grupo controle negativo de morte

(* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

A análise de mediadores secretados mostra o aumento progressivo na secreção de IL-6 a medida em que se aumenta o tempo do extrato. Esta é uma interleucina pró-inflamatória, amplamente encontrada em processos de fase aguda e produzida por diversos tipos celulares, dentre os quais, macrófagos, monócitos, eosinófilos (Oliveira *et al.*, 2011). Por se tratar de um dos mais importantes marcadores de lesão tecidual

(Volp *et al.*, 2008), sugere que todos os instrumentos testados foram capazes de desencadear resposta celular nociva e de caráter inflamatória, promovendo a redução da viabilidade celular observada nos demais ensaios biológicos, em função da exposição aguda aos extratos. Entre os instrumentos, é possível observar que o extrato obtido com RaCe e K3XF desencadearam menor e maior expressão de IL-6, respectivamente, em todos os tempos, e que com o extrato de 90 dias, K3XF induziu uma secreção 5% maior que HyFlex e 40% maior que RaCe. Um dos principais mediadores de estímulo à IL-6 é o $TNF\alpha$, uma citocina igualmente pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos, monócitos e linfócitos-T, capaz de induzir reações de apoptose (Volp *et al.*, 2008), e que se mostrou elevada em todos os extratos.

IL-1 β é uma interleucina pró-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos, assim como IL-6 e secretada em reações de fase aguda. Este estudo mostra que o aumento da secreção de IL-1 β foi bastante significativo para todos os extratos e, com 90 dias, HyFlex CM chega a aumentar 15% da expressão em comparação com RaCe, o instrumento com mais baixo potencial pró-inflamatório. Aqui, temos K3XF mais uma vez demonstrando maior potencial pró-inflamatório, com aumento de 16% em comparação com RaCe e 40x maior que o controle negativo de morte. Considerando que a alta concentração de IL-1 β seja capaz de produzir inflamação em nível sistêmico através da ciclooxigenase-2 (COX-2), pela formação de prostaglandina-2 (PGE₂) no hipotálamo anterior (Oliveira *et al.*, 2011), a exposição crônica ao instrumento K3XF, poderia atuar como um agente pró-pirético. As interleucinas do tipo 1 são potentes indutoras de outras entidades importantes no processo inflamatório, como a própria IL-6 e MIP-1, outro mediador com que apresentou secreção expressiva neste estudo. A Proteína Inflamatória de Macrófago- β , também denominada CCL4, é uma citocina quimiotática (quimiocina) com propriedade pró-inflamatória, altamente responsiva aos estímulos inflamatórios, tanto de natureza aguda quanto crônica (Ren *et al.*, 2010). Os dados mostram a expressão desta quimiocina 11,1% maior em extratos contendo HyFlex CM e 24,5% maior em extratos contendo K3XF

IL-10 e IL-13 são interleucinas de natureza anti-inflamatória, sintetizadas por células imunológicas, como linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e monócitos. A IL-10 possui capacidade de estimular a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias, além de inibir citocinas de natureza pró-inflamatória, como IL-1 e IL-6 produzidas por

macrófagos ou monócitos ativados. A IL-13, em contrapartida, pode inibir a interleucina-10 para não exacerbar a resposta anti-inflamatória e tem alto potencial sobre a inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF α (Oliveira *et al.*, 2011). Neste estudo, o seu aumento em ambas as interleucinas sugere uma relação responsiva direta aos mediadores de natureza pró-inflamatórios de fase aguda e corrobora a teoria de injúria causada pela presença de partículas deletérias de Ni e/ou Ti às células testadas. É natural que diante de uma exposição crônica, IL-10 e os mediadores pró-inflamatórios sofressem redução pela ação de citocinas desta natureza.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da morfometria revelou que os instrumentos atendem a recomendação da norma ANSI/ADA nº101, 2001, entretanto, por MEV foi possível observar que os instrumentos K3 apresentam muitas marcas de usinagem enquanto K3XF mostra inúmeras microcavidades em seu acabamento, que podem estar relacionadas ao maior teor de Níquel na liga. Todos os instrumentos apresentaram fratura do tipo dúctil e não sofreram alteração da estrutura microcristalina, mesmo após sucessivos ciclos de esterilização. Entretanto, o ensaio de flexão em 45° revelou aumento da rigidez de todos os instrumentos com o maior número de esterilizações. Em flexão rotativa, todos os instrumentos apresentaram redução da vida em fadiga com a ciclagem térmica, com atenção especial ao instrumento HyFlex CM, cujo NCF reduziu aproximadamente 62%. Os ensaios de biológicos via Contato Direto demonstraram citotoxicidade em exposição crônica de 30 dias, com significativa redução da viabilidade celular, para todos os instrumentos, sendo o mais citotóxico K3XF, capaz de reduzir a população de células viáveis em até 55,76%, seguido de RaCe, com redução de 41,39%. Os ensaios via Contato Indireto corroboram os achados via Contato Direto e mostram que quanto maior o tempo de permanência do instrumento com o meio para formação do extrato, maior foi o potencial tóxico para células L929. Os instrumentos do tipo K3XF também demonstraram maior citotoxicidade via Contato Indireto, chegando a reduzir a viabilidade celular em 56% com extrato de 90 dias, seguido de HyFlex CM com redução de 52% e RaCe, 40%. O alto teor de Ni, aparente na formação de precipitado de 2ª fase incoerente da liga de K3XF pode ser um fator potencializador do efeito

tóxico destes instrumentos, sendo necessários mais estudos para determinar o perfil constituinte da liga. Quanto aos demais instrumentos, a ordem de citotoxicidade pode revelar que a avaliação por Contato Direto seja relevante para análise de exposição aguda, porém deficiente para expressar atividade nociva dos instrumentos em exposição crônica, pois a manutenção da cultura implica na substituição de meio nutritivos periodicamente, o que poderia carrear parte dos íons nocivos liberados presentes no sobrenadante, e na dificuldade de atingir a subconfluência sugerida pela norma em tempos de exposição crônica maiores que 30 dias. Ao analisar os mediadores secretados pelas células THP-1, observou-se aumento progressivo da expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ou seja, extratos obtidos com maiores tempos de contato com os instrumentos, revelaram maior potencial nocivo às células, sendo K3XF o instrumento mais deletério em todos os tempos de extrato, seguido de HyFlex CM e RaCe. Vale ressaltar que a alta citotoxicidade, associado ao aumento de rigidez e redução de vida útil em fadiga após ciclagem térmica apresentados por K3XF e HyFlex CM, sugere o uso cauteloso destes instrumentos e avaliação adequada do prognóstico clínico diante da fratura dos mesmos, pois o risco de insucesso do tratamento pode estar intimamente relacionada à fatores intrínsecos à liga e processo de fabricação destes instrumentos. Estudos futuros devem ser propostos a fim de quantificar o teor de níquel e titânio presente nos extratos a fim de justificar a capacidade deletéria dos diferentes instrumentos sobre cultura celular.

REFERÊNCIAS

ABOUD, Lilian Rachel de Lima. Dissolução ativa de NiTi - Aplicação a processo de remoção de fragmentos de limas endodônticas rotatórias. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe_m/LilianRachelDeLimaAboud.pdf>. Acesso em: 7 mai. 2018.

ADA Concil on Scientific Affairs; ADA Council on Dental Praticce. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory. **Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 5, p. 672-680, mai. 1996. Disponível em: <[https://jada.ada.org/article/S0002-8177\(15\)61525-2/pdf](https://jada.ada.org/article/S0002-8177(15)61525-2/pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2018.

ANDERSON, Margot E; PRICE, John W. H; PARASHOS, Peter. Fracture Resistance of Electropolished Rotary Nickel-Titanium Endodontic Instruments. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 10, p. 1212-1216, out. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239907006425>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

ARMITAGE, David A; PARKER, Terry L; GRANT, David M; Biocompatibility and hemocompatibility of surface-modified NiTi alloys. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 66, n. 1, p. 129-137, jul. 2003. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(15\)00070-9/pdf](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(15)00070-9/pdf)>. Aceso em: 21 abr. 2017.

ANSI/ADA Council on Scientific Affairs – Specification nº 101. Root Canal Instruments: General requirements. **American Dental Association Council on Scientific Affairs**, ago. 2001. Disponível em: <https://webstore.ansi.org/preview-pages/ADA/preview_ANSI+ADA+Specification+No.+101-2001.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2017.

BASRANI, Bettina; ROTH, Karina; SAS, Geoffrey; KISHEN, Anil; PETERS, Ova A. Torsional profiles of a new and used Revo-S rotary instruments: An *in vitro* study. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 989-992, jul. 2011. Disponível em:

<[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)00420-1/fulltext](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)00420-1/fulltext)>. Acesso em: 14 mai. 2016.

BOGDANSKI, Denise; KÖLLER, Manfred, MÜLLER, Dietmar, MUHR, Gert; BRAM, Martin; BUCHKREMER, Hans Peter; STÖVER, Detlev; CHOI, Jongsik; EPPLE, Matthias. Easy assessment of the biocompatibility of Ni-Ti alloys by in vitro cell culture experiments on a functionally graded Ni-NiTi-Ti material. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 2549-4555, dez. 2002. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0142961202002004/1-s2.0-S0142961202002004-main.pdf?tid=0f14dce5-1c44-4998-b6af-073d8a8104bd&acdnat=1521255476_ac406aa6113a6d62f05c6e2e3278c249>. Acesso em: 21 abr. 2017.

CALLISTER JR., Willian D. Materials science and engineering: **An introduction**. 6. ed. EUA: IE- Wiley, 2002.

CASPER, Rhett B.; ROBERTS, Howard W.; ROBERTS, Mark D.; HIMEL, Van T.; BERGERON, Brian E. Comparison of autoclaving effects on torsional deformation and fracture resistance of three innovative endodontics file systems. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 11, p. 1572-1575, nov. 2011. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)00869-7/fulltext](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)00869-7/fulltext)>. Acesso em: 13 ago. 2017.

CASTILHO, Weimar Silva; DA SILVA, Edson Paulo. Algumas aplicações das ligas com memória de forma Shape Memory Alloys – SMA. **Sinergia**, v. 12, n. 1, p. 99-108, jan. 2011. Disponível em: <http://www.poli.usp.br/d/PMR5222/pmr5222_SMA.pdf>. Acesso em: 14 set. 2019.

DIAS, Douglas Souza; RIBEIRO, Guilherme Dias; MARTUCHE, Ranna da Silva; ANTUNES, Henrique dos Santos; VIEIRA, Victor Talarico Leal; SILVA, Emmanuel João Nogueira Leal. Análise morfométrica e flexão rotativa de instrumentos tipo K de uma empresa nacional. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, n. 2, p. 96-100, abr. /jun. 2017. Disponível em: <<http://revodonto.bvsalud.org/pdf/rbo/v74n2/a04v74n2.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

ES-SOUNI, Mohammed; ES-SOUNI, Martha; FISCHER-BRANDIES, Helge. Assessing the biocompatibility on NiTi shape memory alloys used for medical applications. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1. P. 557-567, fev. 2005. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez29.capes.proxy.ufrj.br/content/pdf/10.1007%2Fs00216-004-2888-3.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2017.

HILFER, Paul; BERGERON, Brian; Mayerchak, Michael, ROBERTS, Howard, JEANSONNE, Bille. Multiple autoclave cycle effects on cyclic fatigue of nickel-titanium rotary files produced by new manufacturing methods. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 1, p. 72-74, jan. 2011. Disponível em: <[https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(10\)00802-2/pdf](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(10)00802-2/pdf)>. Acesso em: 28 mar. 2016

ISO, International standard: **Biological Evaluation of Medical Devices** 10993 - Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods, 1992. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/36406.html>>. Acesso em: 25 mai. 2016.

JAUREGUIZHAR, Sebastián; SOUL, Hugo; CHAPETTI, Mirco; YAWNY, Alejandro. Characterizations of fatigue life of ultrafine grained NiTi superelastic wire under uniaxial loading. **Procedia Material Science**, v. 9, p. 326-334, 2015. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2211812815001856?token=D48BA1B228523D3BE4235EDD970A8E68A261172BC5228FC4B4295F3F7CAA3916C4B5DB6945208961D90B883F3C4B20D5>>. Acesso em: 26 de jul. 2019.

LOPES, Hélio Pereira; CARVALHO, Bianca Correia de Queiroz; DE GOIS, Robson Bezerra; INOJOSA, Inês de Fátima de Azevedo Jacinto; ELIAS, Carlos Nelson; VIEIRA, Victor Talarico Leal; DE SOUZA, Letícia Chaves. Influência de diferentes métodos de fabricação no comportamento mecânico de instrumentos endodônticos de Níquel-Titânio. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 13, n. 2, p. 183-188, abr/ jun. 2013. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/8c3d/c3c65ac62dcff739bc624c6e485ccb2de650.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2019.

LOPES, Hélio Pereira.; ELIAS, Carlos Nelson; VIERA, Victor Talarico Leal; MOREIRA, Edson J. L.; MARQUES, Raquel. V. L.; OLIVEIRA, Julio. C. Machado; DEBELIAN, Gilberto; SIQUEIRA, José. F. Siqueira Jr. Effects of Electropolishing Surface

Treatment on the Cyclic Fatigue Resistance of BioRace Nickel-Titanium Rotary Instruments. **Journal of Endodontic**, v. 36, n. 10, p. 1653-1657, out. 2010. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(10\)00550-9/pdf](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(10)00550-9/pdf)>. Acesso em: 24 mai. 2016.

LOPES, Hélio Pereira; ELIAS, Carlos Nelson; VIEIRA, Márcia Valéria Bousada; MANGELLI, Marcelo; SOUZA, Leticia Chaves De; VIEIRA, Victor Talarico Leal. Bending resistance of conventional NiTi and M-wire endodontic instruments. A comparative study. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 2, p. 170-177, jul./dez. 2011. Disponível em: <<http://revodonto.bvsalud.org/pdf/rbo/v69n2/a06v69n2.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.

LOPES, Hélio Pereira; SOARES, Thaianne Gambarra; ELIAS, Carlos Nelson.; SIQUEIRA, José F.; INOJOSA, Inês de Fátima de Azevedo Jacinto; LOPES, Weber S. P.; VEIRA, Victor Talarico Leal. Comparison of the Mechanical Properties of Rotary Instruments Made of Conventional Nickel-Titanium Wire, M-Wire, or Nickel-Titanium Alloy in R-Phase. **Journal of Endodontic**, v. 39, n. 4, fev. 2013. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(12\)01209-5/pdf](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(12)01209-5/pdf)>. Acesso em: 25 mai. 2016.

LOPES Hélio Pereira, SIQUEIRA JR José Freitas. Endodontia: **Biologia e Técnica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 419-480, 2004.

LOPES, Hélio Pereira; PRADO, Marco Aurélio Rodrigues; ELIAS, Carlos Nelson; FIDEL, Rivail Antônio Sérgio; MOREIRA, Edson Jorge Lima. Influência da conicidade de instrumentos endodônticos de NiTi na Flexibilidade e no número de ciclos à fadiga. **Revista Odontológica do Brasil-Central**, n. 17, v. 43, p. 65-72, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.robrac.org.br/seer/index.php/ROBRAC/article/view/54/44>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

MORAIS, Liliane Siqueira; GUIMARÃES, Glacio Serra; ELIAS, Carlos Nelson. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Dental Press de Ortodontia e**

Ortopedia Facial, v. 12, n.6, p. 48-53, nov. /dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/dpress/v12n6/a06v12n6.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2018

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, mai. /jun. 1983. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.9709&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros de; SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado; GEROLA, Luis Roberto; SALOMÃO, Reynaldo. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, mar. /abr. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rba/v61n2/v61n2a14.pdf>>. Acesso em: 12 jun 2019.

PARASHOS, Peter; MESSER, Harold H. Rotary NiTi Instrument Fracture and its Consequences. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 1031-1043, nov. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239906005619>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

PERES, Rafael Vidal; FERNANDES, Daniel Jogaib; RUELLAS, Antônio Carlos de Oliveira; ELIAS, Carlos Nelson. Propriedades em flexão de fios de liga de Ni-Ti. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 2, p. 266-271, jul. 2012. Disponível em: <<http://revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/view/388>>. Acesso em: 13 out. 2019.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, mai. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v38n7/0100-4042-qn-38-07-0957.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

QUADRAS, Dilip Daniel; NAYAK, U. S. Krishna; KUMARI, N. Suchetha; PRIYADARSHINI, H. R; GOWDA, Srinivasa; FERNANDES, Bennete; PUJARI, Prashant. *In vivo* Study on Release of Nickel, Chromium, and Zinc and DNA Damage in Buccal Mucosa Cells from Patients Treated with Fixed Orthodontic Appliances. **Journal of Indian Orthodontic Society**, n. 52, p. 115-119, mai. 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324498976_In_vivo_study_on_release_of>

_nickel_chromium_and_zinc_and_dna_damage_in_buccal_mucosa_cells_from_patients_treated_with_fixed_orthodontic_appliances>. Acesso em: 26 jun. 2019

REN, Min; GUO, Qing; GUO, Liang; LENZ, Martin; QIAN, Feng; KOENEN, Rory R; XU, Hua; SCHILLING, Alexander B; WEBER, Christian; YE, Richard D; DINNER, Aaron R; TANG, Wei-Jen. Polymerization of MIP-1 Chemokine (CCL3 and CCL4) and Clearance of MIP-1 by Insulin-degrading Enzyme. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 23, p. 3952-3966, out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020635/pdf/emboj2010256a.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

RODRIGUES, Renata C. V.; LOPES, Hélio Pereira; ELIAS, Carlos Nelson; AMARAL, Georgiana; VIEIRA, Victor Talarico Leal; MARTIN, Alexandre S. De. Influence of different manufacturing methods on the cyclic fatigue of rotary nickel-titanium endodontic instruments. **Journal of Endodontic**, v. 37, n. 11, p. 1553-1557, nov. 2011. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)00945-9/pdf](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)00945-9/pdf)>. Acesso em: 25 mai. 2016.

ROGERO, Sizue Ota; LUGÃO, Ademar Benévolo; IKEDA, Tamiko Ikeda; CRUZ, Áurea Silveira Cruz. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mr/v6n3/a03v6n3.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2016.

SANTOS, Rogério Lacerda; PITHON, Matheus Melo; NASCIMENTO, Leonard Euler A. G; MARTINS, Fernanda Otaviano; ROMANOS, Maria Teresa Villela; NOJIMA, Matilde da Cunha G; NOJIMA, Lincoln Issamu; RUELLAS, Antônio Carlos de Oliveira. Cytotoxicity of electric spot welding: an *in vitro* study. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 16, n. 3, p. 57.e1, mai./ jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/dpjo/v16n3/en_a06v16n3.pdf>. Acesso em 27 jan. 2018.

SCHUTTE, Robert J; PARISI-AMON, Andreina; REICHERT, W. Monty. Cytokine profiling using monocytes/ macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface chemistries. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 88, n. 1, p. 128-139, jan. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070304/>>. Acesso em: 13 out. 2019.

SGAMBITTERRA, Emanuele; MAGARÒ, Pietro; NICCOLI, Fabrizio; RENZO, Danilo; MALETTA, Carmine. Low-to-high cycle fatigue properties of a NiTi shape memory alloy. **Procedia Structural Integrity**, v. 18, p. 908-913, jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452321619304524>>. Acesso em: jan. 2020.

SHEN, Ya; PENG, Bin; CHEUNG, Gary Shun-pan. Factors associated with the removal of fractured NiTi instruments from root canal systems. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, en Endodontology**, v. 98, n. 5, p. 605-610, nov. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210404002884#!>>. Acesso em: 28 jun. 2019.

SHEN, Ya; QIAN, Wei; ABTIN, Houman; GAO, Yuan, HAAPASALO. Fatigue testing of controlled memory wire nickel-titanium rotary instruments. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 997-1001, mai. 2012. Disponível em: <[https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)00414-6/pdf](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)00414-6/pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2018.

SHI, Yufang; LIU, Catherine H; ROBERTS, Arthur I; DAS, Jyoti; XU, Guangwu; REN, Guangwen; ZHANG, Yingyu; ZHANG, Liying; YUAN, Zeng Rong; TAN, Hung Sheng William; DAS, Gobardhan; DEVADAS, Satish. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 126-133, fev. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/7310017.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

SOARES, Thaianie Gambarra. Ensaio de flexão em 45° e de flexão rotativa (estático e dinâmico) de dois instrumentos mecanizados de NiTi. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Estácio de Sá. 2012. Disponível em: <<https://portal.estacio.br/media/3519/thaianie-gambarra-soares-disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

SOUZA, Jorge; BASTO, José, ROSEIRO, Luís; MESSIAS, Ana; DOS SANTOS, João Miguel; PALMA, Paulo. Avaliação da fadiga cíclica de 3 sistemas de limas utilizadas em instrumentação mecanizada. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 46, n. 4, p. 239-245, dez. 2015. Disponível em:

<<https://www.elsevier.es/en-revista-revista-portuguesa-estomatologia-medicina-dentaria-330-articulo-avaliacao-da-fadiga-ciclica-3-S1646289015001910>>. Acesso em: 13 out. 2019.

SPILI, Peter; PARASHOS, Peter; MESSER, Harolf H. The impact of instrument fracture on outcome of endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 12, p. 845-850, dez. 2005. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0099239906611059/1-s2.0-S0099239906611059-main.pdf?_tid=1e22859b-346f-48f0-a4f3-f6b1f5e58a8b&acdnat=1521238170_87f5266727cc23492920a18a6348d8c7>. Acesso em: 14 mai. 2016.

TESTARELLI, Luca; PLOTINO, Gianluca, AL-SUDANI, Dina; VINCENZI, Valantina; GIANSIRACUSA, Alessio; GRNADE, Nicola M.; GAMBARINI, Gianluca. 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, set. 2011. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)00654-6/pdf](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)00654-6/pdf)>. Acesso em: out. 2017.

THOMPSON, S. A. An overview of nickel–titanium alloys used in dentistry. **International Endodontic Journal**, v. 33, p. 297-310, jan. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez29.capes.proxy.ufrj.br/doi/10.1046/j.1365-2591.2000.00339.x/epdf>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

VIEIRA, Victor Talarico Leal. Flexibilidade e resistência à fadiga de instrumentos endodônticos de NiTi. **Tese de Doutorado**. Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais. Instituto Militar de Engenharia. 2013. Disponível em: <http://www.ime.eb.mil.br/arquivos/teses/se4/cm/Tese_Victor_Vieira.pdf>. Acesso em 25 de ago. 2016.

VIEIRA, Victor Talarico Leal; ELIAS, Carlos Nelson; LOPES, Hélio Pereira, MOREIRA, Edson Jorge Lima; SOUZA, Letícia Chaves De. Um instrumento NiTi fabricado por torção: morfologia e propriedades mecânicas. **Dental Press Endodontics**, v. 1, n. 1, p. 21-27, abr/jun. 2011. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/11778959-Um>>.

instrumento-niti-fabricado-por-torca-morfologia-e-propriedades-mecanicas.html>. Acesso em 14 mai. 2017.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro; ALFENAS, Rita de Cássia G; COSTA, MINIM, Valéria Paula Rodrigues, STRINGUETA, Paulo César; BRESSAN, Josefina. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-549, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v52n3/a15v52n3.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

WEFELMEIER, Michael; EVESLAGE, Maria; BÜRKLEIN, Sebastian; OTT, Klaus; KAUP, Markus. Removing fractured endodontic instruments with a modified tube technique using a light-curing composite. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 5, p. 733-736, mai. 2015. Disponível em: <[http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(15\)00070-9/fulltext](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(15)00070-9/fulltext)>. Acesso em: jan. 2018.

APÊNDICE A – MÉDIA E DP DOS VALORES DE CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS THP-1 APÓS CONTATO COM EXTRATOS DE 15, 30, 60 E 90 DIAS

Dias	HyFlex CM	RaCe	K3XF	Ctrl-
IL-6 (pg/ml)				
15	2,06 ^{Aa} (0,38)	2,07 ^{Aa} (0,18)	2,49 ^{Ba} (0,03)	0,12 ^{Ca} (0,06)
30	3,87 ^{Ab} (0,54)	3,56 ^{Aa} (0,48)	4,96 ^{Ba} (0,31)	0,11 ^{Ca} (0,03)
60	5,94 ^{Ac} (0,42)	5,11 ^{Bb} (0,17)	7,36 ^{Cb} (0,47)	0,13 ^{Da} (0,02)
90	7,20 ^{Ad} (0,31)	5,38 ^{Bb} (0,28)	7,55 ^{Abc} (0,42)	0,15 ^{Ba} (0,03)
IL-10 (pg/ml)				
15	4,05 ^{ABa} (0,27)	3,75 ^{Aa} (0,13)	4,52 ^{Ba} (0,22)	0,19 ^{Ca} (0,03)
30	10,18 ^{Ab} (0,54)	9,40 ^{Ab} (0,57)	11,42 ^{Ab} (0,92)	0,16 ^{Ba} (0,02)
60	18,35 ^{ABc} (0,50)	16,80 ^{Ac} (0,41)	20,83 ^{Bc} (0,92)	0,15 ^{Ca} (0,02)
90	20,22 ^{Ad} (0,30)	18,87 ^{Ac} (1,04)	22,69 ^{Bc} (0,67)	0,16 ^{Ca} (0,04)
IL-13 (pg/ml)				
15	1,77 ^{Aa} (0,23)	1,79 ^{Aa} (0,09)	1,99 ^{Ba} (0,09)	0,22 ^{Ca} (0,02)
30	2,78 ^{ABb} (0,32)	2,65 ^{ABb} (0,15)	3,18 ^{Aa} (0,24)	0,23 ^{Ba} (0,05)
60	3,55 ^{Ab} (0,14)	3,30 ^{Bc} (0,19)	4,16 ^{Cb} (0,22)	0,22 ^{Da} (0,02)
90	3,48 ^{Ab} (0,15)	3,56 ^{Ac} (0,13)	4,04 ^{Bc} (0,11)	0,23 ^{Ca} (0,00)
TNFα (pg/ml)				
15	1,55 ^{Aa} (0,14)	1,44 ^{ABa} (0,07)	1,75 ^{Aa} (0,18)	0,29 ^{Ba} (0,09)
30	2,51 ^{Aab} (0,15)	2,25 ^{ABab} (0,22)	2,49 ^{Aab} (0,24)	0,31 ^{Ba} (0,07)
60	2,73 ^{ABb} (0,21)	2,50 ^{BCab} (0,21)	2,98 ^{Ab} (0,19)	0,31 ^{Ca} (0,08)
90	2,50 ^{ABab} (0,21)	2,54 ^{ABb} (0,20)	2,74 ^{Ab} (0,32)	0,32 ^{Ba} (0,05)
IL-1β (pg/ml)				

15	2,45 ^{Aa} (0,07)	2,70 ^{Aa} (0,15)	2,62 ^{Aa} (0,12)	0,31 ^{Ba} (0,11)
30	5,83 ^{Ab} (0,49)	5,68 ^{Ab} (0,20)	6,50 ^{Ab} (0,29)	0,28 ^{Ba} (0,04)
60	9,60 ^{ABc} (0,50)	9,35 ^{Ac} (0,15)	10,99 ^{Bc} (0,16)	0,25 ^{Ca} (0,04)
90	11,55 ^{ABd} (0,45)	10,05 ^{Ad} (0,15)	11,68 ^{Bd} (0,17)	0,28 ^{Ca} (0,03)
MIP-1β (pg/ml)				
15	5,24 ^{Aa} (0,02)	4,69 ^{Aa} (0,46)	5,79 ^{Aa} (0,68)	0,37 ^{Ba} (0,11)
30	13,11 ^{ABb} (1,12)	11,17 ^{Ab} (1,00)	14,86 ^{Bb} (0,78)	0,30 ^{Ca} (0,07)
60	24,21 ^{ABc} (0,72)	23,02 ^{Ac} (0,47)	27,72 ^{Bc} (1,26)	0,34 ^{Ca} (0,04)
90	27,51 ^{ABd} (0,78)	24,76 ^{Ad} (0,29)	30,82 ^{Bc} (1,25)	0,37 ^{Ca} (0,04)

*Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os instrumentos ($p < 0,05$)

*Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tempos para um mesmo instrumento e mesma citocina ($p < 0,05$)

ANEXO A – TRABALHOS APRESENTADOS RELACIONADOS AO PROJETO DE PESQUISA PROPOSTO

Título	Estudo de Citotoxicidade de Instrumentos Endodônticos Fabricados com Ligas de Níquel-Titânio e a Influência da Esterilização nas Propriedades Mecânicas
Autores	Lunz, J. S. C; Boldrini, L. C; Granjeiro, J. M; Vieira, V. T. L.
Evento	14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos / 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (Maresias, 2017)

Título	Resistência à flexão e vida em fadiga cíclica de instrumentos reciprocantes Unicone, WaveOne e Reciproc
Autores	Lunz, J. S. C; Da Silva, E. J. N. L; Villarino, T. A. L. S; Vieira, V. T. L.
Evento	Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia – SINCTEC (Duque de Caxias, 2017)

Título	Efeitos da autoclavagem na resistência à fadiga cíclica de instrumentos de NiTi observados por MEV
Autores	Da Silva, E. J. N. L; Lunz, J. S. C; Garcia, E. S. V; Vieira, T. L. V.
Evento	Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia – SINCTEC (Duque de Caxias, 2017)

Título	Correlação do diâmetro do preparo de uma nova geração de instrumentos de NiTi com as dimensões de cones de guta-percha de sua antiga geração através de uma análise morfométrica
Autores	Dos Santos, L. C; Lunz, J. S. C; Da Silva, E. J. N; Vieira, V. T. L.
Evento	Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia – SINCTEC (Duque de Caxias, 2017)

Título	Influência da ciclização nas propriedades mecânicas dos instrumentos endodônticos de Ni/Ti e estudo da citotoxicidade em fibroblastos
Autores	Ferreira, R. S; L. C; Lunz, Vieira, V. T. L.
Evento	III Encontro Científico do Programa de Pesquisas em Bioengenharia e Terapias Celulares do ICB/ UFRJ (Duque de Caxias, 2016)

Título	Caracterização morfométrica e da superfície de acabamento de instrumentos endodônticos de NiTi acionados por motor
Autores	Ferreira, R. S; L. C; Lunz, Vieira, V. T. L.
Evento	X Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia – SINCTEC (Duque de Caxias, 2016)

ANEXO B – TRABALHOS PUBLICADOS RELACIONADOS AO PROJETO DE PESQUISA PROPOSTO

ARTIGO ORIGINAL/ENDODONTIA ::

Correlação do diâmetro do preparo de uma nova geração de instrumentos de NiTi com as dimensões de cones de guta-percha de sua antiga geração através de uma análise morfométrica

Correlation of the diameter preparation of a new generation of NiTi instrument with the dimensions of gutta-percha points of its old generation through a morphometric analysis

Marja Ribeiro da Silva dos Santos Oliveira,¹ Eduardo Paulo Carvalho,¹ Jacqueline Silva Cardoso Lunz,² Emmanuel João Nogueira Leal da Silva,^{1,2,3} Edson Jorge Lima Moreira,^{1,2,3} Victor Talarico Leal Vieira^{1,2,3}

¹Faculdade de Odontologia, Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, Brasil

²Programa de Pós-graduação Biotrans, Faculdade de Odontologia, Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, Brasil

³Programa de Pós-graduação Odontoclinex, Faculdade de Odontologia, Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, Brasil

• Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho teve o objetivo de determinar as dimensões e verificar se os instrumentos X1, X2 e X3 atendem as recomendações da norma ANSI/ADA nº 101 e se os cones de guta-percha F1, F2 e F3 atendem a norma ANSI/ADA nº 78. **Material e Métodos:** Os resultados dos instrumentos foram comparados com as dimensões dos cones de guta-percha. Foram utilizados 10 instrumentos e 10 cones de cada tipo. As imagens para análise micromorfométrica foram obtidas com uma lupa OptiCam e as medidas determinadas com o software TSView versão 7.2.1.7. Os diâmetros em D3, D6 e D9 reais foram comparados com os nominais pelo teste t-student. Os diâmetros dos instrumentos em D3, D6 e D9 foram comparados com os dos cones pelo teste Anova e complementados com teste de comparações múltiplas SNK. Todos os testes adotaram nível de significância $\alpha=5\%$. **Resultados:** Os resultados obtidos mostraram que há diferença estatisticamente significante entre as dimensões reais e nominais dos instrumentos ($p < 0,05$). O instrumento X3 apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao cone F1 ($p < 0,05$), onde os valores do cone são menores do que os dos instrumentos. **Conclusão:** Dentro das limitações deste estudo pôde-se concluir que: os instrumentos X1 e os cones de guta-percha não atenderam as recomendações de suas normas. O cone F1 pode ser uma opção para obturação dos canais modelados com o instrumento X3, porém a termoplastificação se faz necessária.

Palavras-chave: Instrumentos de NiTi, Cones de guta-percha, Análise micromorfométrica.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to verify if the Protaper Next instruments X1, X2, and X3 and the Protaper Universal gutta-percha cones F1, F2, and F3 meet the ANSI/ADA 101 and 78 recommendations. **Material and Methods:** The instruments' dimensions were compared with those obtained by the gutta-percha cones. For this, ten instruments and ten cones of each type were used. Micromorphometric images were obtained and analyzed through a stereomicroscope (OptiCam) and measurements were obtained with TSView software, version 7.2.1.7. The D3, D6, and D9 diameters were compared with the nominal diameters using the Student's t-test. After this, the real diameters of the instruments D3, D6, and D9 were compared with the gutta-percha cone diameters by Anova supplemented with SNK test for multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered significant. **Results:** The results showed statistically significant differences between the real diameter and nominal diameter of the instruments ($p < 0.05$). The X3 instrument showed a statistically significant difference when compared to the F1 cone ($p < 0.05$), and the cone values were lower than the instrument values. **Conclusion:** Within the limitations of this study, it can be concluded that: 1) the X1 instrument and the gutta-percha points did not meet the recommendations, and 2) the F1 cone can be an option for filling the modeled channels with the X3 instrument, but termoplastification is required.

Keywords: NiTi instruments; Gutta-percha cones; Micromorphometric analysis.

Introdução

O tratamento endodôntico é baseado em etapas de igual importância: limpeza, modelagem e obturação do sistema de canais radiculares. O surgimento dos instrumentos de níquel-titânio (NiTi) tem proporcionado maior facilidade e segurança na limpeza e modelagem dos canais radiculares.¹ A etapa de obturação foi simplificada uma vez que os fabricantes desenvolvem cones de guta-percha correspondentes aos instrumentos, porém nem sempre estes estão acessíveis no mercado.

O sistema de instrumentos Protaper Next da Dentsply Maillefer consiste de cinco tipos de limas com conicidade variada na ponta (X1 17/04; X2 25/06; X3 30/07; X4 40/06; X5 50/06) e estão disponíveis em três comprimentos (21mm, 25mm e 31mm).^{2,3}

Os instrumentos Protaper Next possuem propriedades mecânicas superiores a outros sistemas de rotação contínua⁴ e apresentam menor extrusão de debris quando comparados ao sistema Protaper Universal.⁵ Por isso, este sistema tem sido utilizado como uma alternativa para profissionais que ainda não utilizam a instrumentação com cinemática recíproca.

O sistema Protaper Next disponibiliza cones de guta-percha com forma e tamanhos padronizados que correspondem às dimensões obtidas após a instrumentação do canal para reduzir o tempo clínico.³ Entretanto, os profissionais que optam por adotar esse sistema encontram como desafio à sua utilização a não comercialização desses cones no país. A opção para solucionar tal problema é utilizar cones de outros sistemas como do sistema Protaper Universal para a obturação dos canais.

Alguns estudos determinaram as medidas nominais dos instrumentos Protaper Next³ assim como as medidas dos cones e dos instrumentos Protaper Universal.^{6,7} Muitas vezes os diâmetros não são compatíveis com os reais⁸⁻¹⁰ o que pode gerar dificuldades na etapa de obturação. O conhecimento das dimensões dos instrumentos e dos cones utilizados no preparo do canal é importante.

Os objetivos do presente estudo são: (1º) verificar se os instrumentos atendem as tolerâncias estabelecidas pela norma

Correlação dos diâmetros e conicidades de instrumentos reciprocantes com cones de guta-percha para obturação com cone único

Victor Talarico Leal **VIEIRA**^{1,2,3}
 Emmanuel João Nogueira Leal da **SILVA**^{1,2,3}
 Paula Regina Nepomuceno Dias **RODRIGUES**²
 Luana Castro Andrade da **SILVA**²
 Jaqueline Silva Cardoso **LUNZ**³
 Marjorie Dardis **MURUCCI**³
 Leonardo da Cunha Boldrini **PEREIRA**³

DOI: <https://doi.org/10.14436/2358-2545.9.3.062-066.oar>

RESUMO

Objetivo: o presente estudo teve como objetivo caracterizar as dimensões dos instrumentos Reciproc R25 e X1 Blue File, e dos cones de guta-percha da Mk Life R25, Reciproc R25 e DiaDent R25, para verificar qual cone de guta-percha se adapta melhor no preparo dos instrumentos. **Métodos:** dez instrumentos Reciproc R25 25/0,08v e X1Blue File 25/0,06; e dez cones de guta-percha DiaDent R25, Mk Life R25 e Reciproc R25 foram utilizados. As imagens foram obtidas através de uma lupa estereoscópica com uma câmera digital acoplada. As medidas foram obtidas através do programa TS View. Os diâmetros dos instrumentos e dos cones de guta-percha foram determinados em D0 até D9, com intervalos de medidas de 1,0 mm; e a conicidade foi calculada adotando-se os diâmetros D8 e D1. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa *Primer*

of biostatistics versão 6.0. **Resultados:** apesar da maior conicidade dos instrumentos X1Blue file (0,07mm/mm), não houve diferença estatisticamente significativa entre os instrumentos nos três primeiros milímetros ($p > 0,05$), o mesmo ocorreu para a conicidade dos cones ($p > 0,05$). Os cones de guta-percha apresentaram diferença estatisticamente significativa em todos os diâmetros aferidos ($p < 0,05$). **Conclusão:** os instrumentos e os cones de guta-percha atenderam à recomendação das respectivas normas ANSI/ADA. O cone de guta-percha que apresentou maior compatibilidade dimensional com os diâmetros dos instrumentos foi o MK life, e VDW foi o que apresentou maior desajuste.

Palavras-chave: Instrumentos odontológicos. Guta-percha. Obturação do canal radicular. Materiais restauradores do canal radicular.

Como citar: Vieira VTL, Silva EJNL, Rodrigues PRND, Silva LCA, Lunz JSC, Murucci MD, Pereira LCB. Correlation of the diameters and tapers of reciprocating instruments with gutta-percha points for single-cone root canal filling. *Dental Press Endod.* 2019 Sept-Dec;9(3):62-6.
 DOI: <https://doi.org/10.14436/2358-2545.9.3.062-066.oar>

» Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros, que representem conflito de interesse, nos produtos e companhias descritos nesse artigo.

¹ Universidade do Grande Rio, Programa de Pós-graduação em Odontologia (Duque de Caxias/RJ, Brasil).

² Universidade do Grande Rio, Curso de Graduação em Odontologia (Duque de Caxias/RJ, Brasil).

³ Universidade do Grande Rio, Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (Duque de Caxias/RJ, Brasil).

Recebido: 31/07/2018. Aceito: 21/09/2018.

Endereço para correspondência: Victor Talarico Leal Vieira
 E-mail: victortalarico@yahoo.com.br