

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro**

**BIOCOMPATIBILIDADE DO TRICRESOL FORMALINA ATRAVÉS DE  
TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE EM CÉLULAS  
MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO**

**Santa Maria, RS**

**2016**

**Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro**

**BIOCOMPATIBILIDADE DO TRICRESOL FORMALINA ATRAVÉS DE TESTES  
DE CITOGENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE  
PERIFÉRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Cirurgião Dentista**.

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia da Silva Schmitz**

**Santa Maria, RS  
2016**

**BIOCOMPATIBILIDADE DO TRICRESOL FORMALINA ATRAVÉS DE TESTES  
DE CITOGENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE  
PERIFÉRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Graduação em Odontologia da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,  
RS), como requisito parcial para obtenção do  
grau de **Cirurgião Dentista**.

Aprovado em 29 de novembro de 2016:



**Márcia da Silva Schmitz, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Renata Dornelles Morgental, Dra.(UFSM)**



**Sidney Ricardo Dotto, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*Primeiramente a Deus, Pai Celestial, Grande Arquiteto do Universo, por nos Iluminar com Suas bênçãos e nos conceder o privilégio de viver.*

*À minha família por todo o apoio, amor e dedicação em todos os momentos de minha vida. Vocês são os meus maiores e mais valiosos tesouros e exemplos que poderiam haver.*

*Por fim, a meu amor, companheira e grande incentivadora, Mayara Biondo Brasil, por suas palavras de motivação e compreensão com os momentos de fraqueza ou falhas e pela alegria e felicidade nos momentos de vitória.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, mestre e amiga, Professora Márcia da Silva Schmitz, por me proporcionar aprender a cada dia e da melhor forma possível: praticando. Seus ensinamentos, nossas conversas e os desafios que me incentivou a vencer foram alicerces que contribuíram decisivamente para minha formação e mudaram minha forma de perceber a Odontologia.

À professora Michele Rorato Sagrillo por toda a ajuda, desprendimento e dedicação para conosco. Este projeto seria inviável sem a sua participação.

Aos professores Sidney Ricardo Dotto e Renata Dornelles Morgental por terem aceitado o convite de participar desta banca e contribuírem para o engrandecimento de nosso trabalho e, ainda mais, de nossa formação acadêmica e pessoal.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. Suas contribuições vão além da simples participação, existe um pouco de cada um de nós nessa pesquisa.

Aos colegas, mestres e funcionários, pois sem a sua participação decisiva no processo de ensino do Curso de Odontologia não poderíamos lograr êxito em nossa formação.

Aos amigos, que puderam estar presentes ou não no dia de apresentação deste trabalho. Vocês são a base sólida e o ombro forte em que busco me apoiar, a vocês registro o meu mais sincero muito obrigado.

## EPÍGRAFE

*O nosso maior medo não é sermos inadequados. O nosso maior medo é que sejamos poderosos além da conta. É a nossa luz, não a nossa escuridão, o que mais nos assusta. Ato insignificantes não servem para mundo. Não há nada de engrandecedor em se encolher para que os outros à nossa volta não se sintam inseguros. Todos nascemos para brilhar, como fazem as crianças. Não está só em alguns de nós, mas em todos. E a medida que deixamos a nossa luz brilhar, inconscientemente, damos permissão para os outros fazerem o mesmo. Quando nos libertamos de nossos medos, nossa presença automaticamente liberta os outros.*

*(Trecho do filme “Coach Carter – Treinando para a Vida”)*

## RESUMO

# BIOCOMPATIBILIDADE DO TRICRESOL FORMALINA ATRAVÉS DE TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO

AUTOR: Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro

ORIENTADORA: Márcia da Silva Schmitz

As técnicas de preparo e soluções irrigadoras não mostram evidências de uma completa desinfecção do sistema de canais radiculares nos casos de necrose pulpar, onde, é recomendado o uso de medicação intra-canal entre sessões. Estudos de citotoxicidade não apresentam convergência de resultados quanto ao efeito citotóxico do tricresol formalina. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cito-genotóxicos do tricresol formalina em células mononucleadas de sangue periférico em cultura, através da viabilidade celular, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano de DNA. Foram utilizados 12 incisivos inferiores permanentes humanos. Após o preparo endodôntico nos comprimentos radiculares de 11 e 15 milímetros, foi aplicada uma medicação intracanal de tricresol formalina no interior da câmara pulpar, selado a cavidade e posicionado o elemento dentário sobre um poço de cultura por períodos de 24 e 72 horas. O meio de cultura contendo as células foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado 100mM de peróxido de hidrogênio no meio. Os resultados obtidos foram tabulados e analisados pelo teste de variância (ANOVA) de 1 via, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5%. O tricresol formalina não apresentou citotoxicidade significativa em 24 horas de incubação a uma distância de 15 milímetros do meio de cultura ( $P < 0,05$ ). Nos demais parâmetros de tempo e distância foi significativamente citotóxico ( $P < 0,05$ ). Em 24 horas de incubação, não foram registrados danos de DNA pela solução testada ( $P < 0,05$ ). Após 72 horas o tricresol formalina foi capaz de gerar danos de DNA em CMSP ( $P < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Endodontia. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Formaldeído. Tricresol formalina.

## ABSTRACT

# BIOCOMPATIBILITY OF TRICRESOL FORMALIN THROUGH CYTOGENOTOXICITY TESTS ON PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

AUTHOR: Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro

ADVISOR: Márcia da Silva Schmitz

Irrigations solutions and techniques did not show evidences of a complete disinfection of root canal system, in pulpar necrosis. Therefore, the use of intracanal medications between sessions is recommended. Cytotoxicity studys did not show convergence of results about the cytogenotoxic effects of tricresol formalin. The goal of this study was to evaluate the biocompatibility of tricresol formalin on PBMC in culture through cell viability, lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA damage assays. Twelve human permanent mandibular incisors were used. After endodontic preparation at 11 and 15 millimeters root lengths, an intracanal tricresol formalin medication was applied, the pulp chamber sealed and the tooth was positioned on a culture well for periods of 24 and 72 hours. The culture medium containing the cells was used as a negative control and as a positive control hydrogen peroxide was used in the medium. The results was tabulated and analyzed by the 1-way ANOVA, followed by the Tukey test. Statistical significance was set at 5%. Tricresol formalin did not show cytotoxicity at the distance of 15 millimeters and in a 24 hour incubation period ( $P < 0,05$ ). At the other distances and times it was considered to be significantly cyotoxic ( $P < 0,05$ ). In 24 hours of incubation, DNA damage was not registered in both lengths ( $P < 0,05$ ). After 72 hours, the tested solution induced DNA damage in PBMC ( $P < 0,05$ ).

**Keywords:** Endodontics. Cytotoxicity. Genotoxicity. Formaldehyde. Tricresol Formalin.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos indexados ao PubMed que avaliaram efeitos cito e genotóxicos de medicamentos à base de formaldeído.....	14
Quadro 2 – Organização dos grupos de estudo.....	17

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Autorização do Departamento de Estomatologia.....	36
Apêndice B – Termo de Autorização Institucional.....	38
Apêndice C – Declaração do Banco de Dentes Permanentes Humanos (BDPH-UFSM) ao Comitê de Ética em Pesquisa.....	40
Apêndice D – Termo de Confidencialidade.....	41
Apêndice E – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de Dimensionamento, preparo e posicionamento dos espécimes para ensaios de toxicidade.....	20
Figura 2 – Classificação do Dano ao DNA.....	22
Figura 3 – Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) com 24 horas de incubação.....	25
Figura 4 – Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) com 72 horas de incubação.....	25
Figura 5 – Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS) em 24 horas de incubação.....	26
Figura 6 – Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS) em 72 horas de incubação.....	26
Figura 7 – Ensaio de Carbonilação de Proteínas em 24 horas de incubação.....	27
Figura 8 – Ensaio de Carbonilação de Proteínas em 72 horas de incubação.....	27
Figura 9 – Ensaio Teste Cometa em 24 horas de incubação.....	28
Figura 10 – Ensaio Teste Cometa em 72 horas de incubação.....	28

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	17
3.2 DESENHO DO ESTUDO, COLETA DE DADOS E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS TESTE.....	17
3.3 DIMENSIONAMENTO, PREPARO E POSICIONAMENTO DOS ESPÉCIMES.....	18
3.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	20
3.5 TRATAMENTOS.....	22
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ainda nos dias atuais, as técnicas de preparo mecânico, associadas ao uso de soluções irrigadoras, não mostram eficácia na completa desinfecção do sistema de canais radiculares nos casos de necrose pulpar, o que justifica o uso de soluções que atuam como medicação intra-canal entre sessões<sup>36, 40</sup>. Estas soluções devem apresentar eficaz poder antimicrobiano, além de ser necessário que sejam biocompatíveis aos tecidos perirradiculares dentro das condições de uso clínico<sup>17, 40</sup>.

O tricresol formalina, composto por 90% de formaldeído e 10% de cresol<sup>38</sup>, permanece sendo utilizado no Brasil em tratamentos endodônticos de dentes necrosados e com lesões periapicais<sup>17</sup>. Possui comprovada eficácia em sua ação antimicrobiana<sup>19, 32, 34, 38</sup> e seu mecanismo de ação ocorre a partir da liberação de vapores do formaldeído<sup>7</sup> e ação do cresol – componente altamente lipofílico<sup>20, 28</sup> – sobre as gorduras, dando origem ao lisol e destruindo as bactérias<sup>4</sup>.

Quanto a biocompatibilidade deste medicamento, estudos buscaram avaliar o potencial cito e genotóxico dos seus componentes, em especial o formaldeído, os quais apresentaram divergência de resultados (quadro 1). Além disso, não foram consideradas as condições de uso na prática clínica como parâmetros para condução dos trabalhos.

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos, sendo instrumento de avaliação adequado para ensaios de citogenotoxicidade<sup>18</sup>. As CMSP são capazes de refletir danos recentes, uma vez que, por serem abundantes na circulação sanguínea, podem ser expostas a qualquer agente mutagênico<sup>18</sup>.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos citogenotóxicos do tricresol formalina em CMSP em cultura, através da viabilidade celular, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano de DNA, utilizado-se de uma metodologia que procura se assemelhar à utilização deste medicamento na prática clínica em duas distâncias e dois períodos de tempo distintos.

**Quadro 1.** Estudos indexados ao PubMed que avaliaram efeitos cito e genotóxicos de medicamentos a base de formaldeído

(continua)

Referência	Substâncias Avaliadas	Substrato	Modelo	Ensaio	Resultados
Ribeiro, D.A., Marques, M.E.A., Salvadori, D.M.F., 2004	G1: Formocresol; G2: PMCC; G3: Ca(OH) <sub>2</sub> diluído a 20 µg/ml; G4: Ca(OH) <sub>2</sub> diluído a 40 µg/ml; G5: Ca(OH) <sub>2</sub> diluído a 80 µg/ml.	Células linfoma de ratos e fibroblastos humanos	Tratamentos diretamente no meio	Teste Cometa e teste de viabilidade celular Azul de Tripán	Nenhum dos grupos apresentou dano de DNA
Nishimura, H. et al, 2008	G1: Carbol camphor; G2: PMCC; G3: Formocresol; G4: Ca(OH) <sub>2</sub> ; G5: Iodofórmio.	Células da polpa dentária humana (D824)	Tratamentos diretamente no meio	Teste de Aberrações cromossômicas	G1, G2 e G5 induziram aberrações cromossômicas G3 e G4 não induziram aberrações cromossômicas
Ribeiro, D.A., Marques, M.E.A., Salvadori, D.M.F., 2006	G1: Formocresol; G2: PMCC; G3: Ca(OH) <sub>2</sub> diluído a 100 µg/ml.	Células do ovário de hamsters chineses (CHO cells)	Tratamentos diretamente no meio	Teste Cometa	Nenhum dos grupos apresentou dano de DNA
Goldmacher, V.S. & Thilly, W.G., 1983	G1: Formaldeído	Linfoblastos humanos	Tratamentos diretamente no meio	Teste de sobrevivência celular	G1 é tóxico e mutagênico a partir de concentrações acima de 130µM
Kreiger R.A. & Garry V.F., 1983	G1: Formaldeído	Linfócitos humanos	Tratamentos diretamente no meio	Teste de viabilidade celular	G1 apresentou citotoxicidade significativa

**Quadro 1.** Estudos indexados ao PubMed que avaliaram efeitos cito e genotóxicos de medicamentos a base de formaldeído

(conclusão)

<b>Referência</b>	<b>Substâncias Avaliadas</b>	<b>Substrato</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Resultados</b>
Natarajan, A.T. et al, 1983	G1: Formaldeído	Células do ovário de hamsters chineses (CHO cells)	Tratamentos diretamente no meio	Indução de micronúcleos	G1 aumenta a frequência de aberrações cromossômicas conforme a dose
Ramos M.E.S.P. et al, 2008	G1: Formocresol	Linfócitos humanos e células de ratos suíços	Tratamentos diretamente no meio	Teste Cometa e teste de Indução de micronúcleos	G1 não produz dano de DNA e aumenta frequência de micronúcleos
Vander Wall, G.L., Dowson, J. & Shipman, C., 1972	G1: Formocresol G2: PMCC G3: Cresatin	Células BHK 21/4 e HEL-199	Estudo A: tratamento diretamente no meio Estudo B: tratamento aplicado na câmara pulpar de dente e seu ápice em contato com o meio	Halo de inibição de crescimento celular	Estudo A: G1 é o mais tóxico in vitro Estudo B: G1 não apresentou toxicidade in vitro

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

A avaliar os potenciais efeitos citogenotóxicos do tricresol formalina em células mononucleadas de sangue periférico em cultura nas condições de uso preconizadas por Buckley<sup>4</sup>.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar se há diferença no efeito citogenotóxico do tricresol formalina quando distante 11 milímetros e 15 milímetros do meio de cultura;
- Avaliar o efeito citogenotóxico agudo (24 horas de incubação) e crônico (72 horas de incubação) do tricresol formalina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE número 61012816.1.0000.5346).

#### 3.2 Desenho do estudo, coleta de dados e composição dos grupos teste

Foram utilizados 12 (doze) dentes incisivos inferiores extraídos doados pelo Banco de Dentes Permanentes Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (BDPH-UFSM). A avaliação do potencial citogenotóxico foi realizado em duas distâncias do tricresol formalina (11 e 15 milímetros) da cultura CMSP e em dois tempos, agudo (24 horas) e crônico (72 horas). Os grupos do estudo foram definidos de acordo com o quadro 2.

O acesso coronário e preparo químico-mecânico dos dentes foi realizado na Clínica de Endodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria, por um único operador experiente em Endodontia. Os ensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Centro Universitário Franciscano sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Rorato Sagrillo, professora das disciplinas de Genética Médica e Genética Humana e pesquisadora da instituição supracitada. Os testes foram realizados em triplicata para cada elemento dentário.

Quadro 2 – Organização dos grupos de estudo

(continua)

<b>Grupos</b>	<b>Quantidade de elementos dentários (n)</b>	<b>Comprimento radicular (milímetros)</b>	<b>Medicação intracanal</b>	<b>Período no meio de cultura (horas)</b>
I	3	11	Tricresol Formalina	24
II	3	11	Tricresol Formalina	72
III	3	15	Tricresol Formalina	24

Quadro 2 – Organização dos grupos de estudo

(conclusão)

<b>Grupos</b>	<b>Quantidade de elementos dentários (n)</b>	<b>Comprimento radicular (milímetros)</b>	<b>Medicação intracanal</b>	<b>Período no meio de cultura (horas)</b>
IV	3	15	Tricresol Formalina	72
V	-	-	Controle positivo (C+) - Peróxido de Hidrogênio	24
VI	-	-	Controle positivo (C+) - Peróxido de Hidrogênio	72
VII	-	-	Controle negativo (C-)	24
VIII	-	-	Controle negativo (C-)	72

### 3.3 Dimensionamento, preparo e posicionamento dos espécimes

Os espécimes foram padronizados nos comprimentos radiculares dos grupos de pesquisa, 11 e 15 milímetros, considerando o comprimento médio da raiz de incisivos inferiores<sup>5</sup> e o alcance médio de ação a distância do tricresol formalina<sup>7</sup>. Para obtenção das distâncias a serem testadas, os comprimentos dos dentes da amostra foram aferidos com um paquímetro no sentido apico-incisal, recebendo marcações com o auxílio de uma lapiseira em todas as faces dentárias nas distâncias de 17 ou 21 milímetros (comprimento radicular + 6 mm coronários), conforme grupo teste pré-estabelecido. Em seguida foi realizado um corte com auxílio de um disco diamantado (American Burs, Brasil) e eliminação da porção incisal a partir da marcação realizada previamente, confeccionando-se uma superfície incisal.

A abertura coronária teve como ponto de eleição a porção mais central da superfície incisal, sendo realizada com uma ponta diamantada esférica 1014 (KG Sorensen, Brasil) e a forma de contorno foi dada através de uma broca tronco-cônica multilaminada com ponta inativa Endo Z (Microdont, São Paulo, Brasil), acoplada em uma caneta de alta rotação (Kavo, Brasil), sob refrigeração constante.

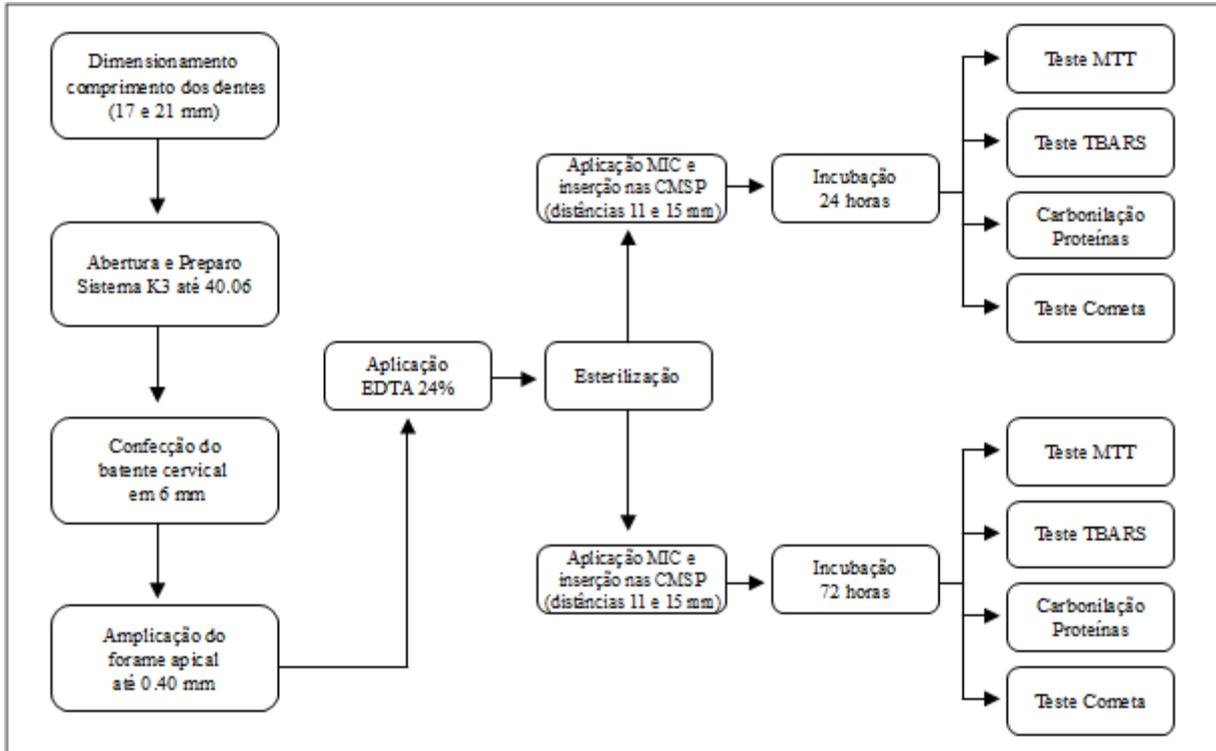
O preparo do canal radicular foi realizado com o sistema rotatório contínuo K3 (Sybron Endo, EUA) até o instrumento 40.06 no comprimento de trabalho de 1 mm aquém do

forame radicular. A cada troca de instrumento, os canais foram irrigados com 2 mL de solução de Hipoclorito de Sódio a 2,5% (Nova Derme, Santa Maria, RS, Brasil), empregando uma seringa de 5 mL (Ultradent Products Inc., South Jordan, Utah, USA) e ponta Navi Tip 30 G (Ultradent Products Inc., South Jordan, Utah, USA) calibrada a 2 mm aquém do comprimento de trabalho com movimentos de vai e vem de amplitude de 2 a 3 mm. Ao mesmo tempo, a aspiração foi realizada com cânula suctora metálica (Golgran, Brasil). A patência apical foi mantida a cada troca de instrumento através da introdução de uma lima K # 10 (Dentsply Maillefer, Brasil) até o forame apical. Brocas de Largo II, III e IV respectivamente foram mensuradas e demarcadas com *stop* de borracha em 6 milímetros com auxílio de uma régua milimetrada de forma que ao serem utilizadas em ordem crescente de diâmetro obtemos um batente que serviu de anteparo onde a “bolinha de algodão” foi acamada. O forame apical foi ampliado com lima manual número 10 do tipo “k” (Dentsply Maillefer, Brasil), inserindo-a no sentido ápico-incisal, pelo forame, até a distância 15 milímetros, com a finalidade de padronizar o orifício de saída da medicação em um diâmetro de 0,40 milímetros.

Após o preparo, foi aplicado EDTA Trissódico gel 24% (Maquira, Brasil) por 3 minutos sob agitação constante e os dentes foram submetidos a autoclavagem (134°C, ciclo 6, durante uma hora) para devida desinfecção.

Para a otimização do manejo dos dentes *ex vivo* foi realizada a imobilização dos espécimes através da inserção dos mesmos em recipientes confeccionados com tubos Eppendorf (Eppendorf, Brasil) de 10 milímetros de diâmetro, estabilizados por uma armação metálica confeccionada com fio ortodôntico de diâmetro 1 milímetro (Morelli, Brasil). Os recipientes foram posicionados de forma a sua porção inferior estar localizada a cerca de 1 milímetro da cultura de células. Os dentes foram posicionados no interior do tubo eppendorff, onde seu ápice transpassou em 2 milímetros a porção inferior do mesmo, estando a região apical do elemento dentário imersa no meio de cultura celular. As etapas supracitadas estão ilustradas na figura 1 na forma de um fluxograma esquemático.

Figura 1 – Fluxograma de Dimensionamento, preparo e posicionamento dos espécimes para ensaios de toxicidade



### 3.4 Ensaios de toxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* foram utilizados os testes: MTT, peroxidação lipídica (TBARS), carbonilação de proteínas e teste cometa para verificação de genotoxicidade do composto.

Coleta de sangue para os ensaios toxicológicos: As amostras de sangue periférico foram obtidas através de três amostras de descarte do Laboratório Escola de Análises Clínicas do Centro Universitário Franciscano, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da instituição (CAAE: 31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação. As amostras foram obtidas através de punção venosa utilizando tubos com heparina tipo Vacutainer®, as quais foram utilizadas para separar as CMSP e posteriores tratamentos em cultura celular.

Separação dos linfócitos e monócitos: As separações das CMSP ocorreram por gradiente de densidade (Histopaque® - 1077) através de centrifugação, e a concentração de  $2 \times 10^5$  células foi obtida por contagem em câmara de *Neubauer* com azul de *Tripán* 0,4 %.

Ensaio de Viabilidade Celular (MTT): A viabilidade celular foi analisada segundo Mosman (1983). A atividade citotóxica em CMSP foi avaliada pelo método colorimétrico, cujo princípio baseia-se na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto de coloração roxo escuro, o MTT-formazan, pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. Como a conversão ocorre somente em células viáveis, a diminuição da absorbância dos testes em relação ao controle negativo, indica a morte celular. O experimento foi realizado em triplicata em placa de ELISA de 96 poços com as amostras e controles como descritos anteriormente. A placa permaneceu em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 e 72 horas, sendo as amostras analisadas em espectrofotômetro a 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

Peroxidação Lipídica (TBARS): A determinação da peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo o método descrito por Ohkawa et al.<sup>24</sup> (1979). Após o tratamento das células, uma alíquota destas foi misturada a um meio de reação contendo ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (0,8%) e incubados a 95 °C por 1 hora. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 532 nm em espectrofotômetro.

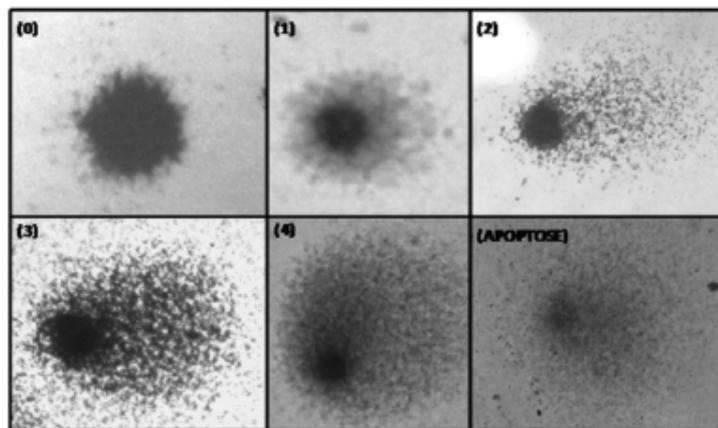
Carbonilação de proteínas: Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina como previamente descrito por Levine et al.<sup>16</sup> (1990). Após homogeneização das amostras em tampão carbonil (120 mM KCl, 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram centrifugadas a 7000 g por 15 min a 4 °C e lisadas em TCA 20%. Após a lise, as amostras foram novamente centrifugadas a 14000 g por 5 min. O pellet foi ressuspense em 100 µL de 0,2 M de NaOH e as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 2 M de HCl (1:3) adicionado de 10 mM de DNPT. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de TCA 20%, e as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 3 min. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol-etilacetato. As amostras foram incubadas por 30 min a 60 °C, centrifugadas novamente a 14 000g por 3 min. O conteúdo de formação de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370 nm.

Teste Cometa: O teste cometa foi realizado de acordo com Singh e colaboradores<sup>35</sup> (1988), modificado por García e colaboradores<sup>9</sup> (2004). Este teste possui alta sensibilidade e possibilita quantificar os níveis de quebras de fitas simples de DNA.

Sobre uma lâmina de vidro previamente coberta com uma camada de agarose 1,5%, depositam-se as CMSP já isoladas e suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting*). O material foi imerso em solução de lise (89mL de solução de lise a 10mL de Dimetil-sulfóxido e 1mL de Triton X-100), para a remoção das membranas e citoplasma das células. Na sequência, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese alcalino (300 mM NaOH e 1mM EDTA em água destilada) e submetidas à eletroforese por cerca de 30 minutos, a 25V e 300mA. Posteriormente, foram realizados os processos de neutralização, fixação e coloração para que, assim, o material genético possa ser analisado.

A análise de cada lâmina foi feita em microscópio óptico e as células classificadas de acordo com o formato da imagem em quatro classes de dano propostas por García e colaboradores<sup>9</sup> (2004) e ilustradas por Fronza e colaboradores<sup>8</sup> (2010), variando de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo), incluindo também a classificação de apoptose celular, conforme a Figura 2.

Figura 2 – Classificação do Dano ao DNA



Classe 0: sem cauda (sem dano); Classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; Classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; Classe 3: com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; Classe 4: cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3; Apoptose: ausência de material genético íntegro e condensado.

### 3.5 Tratamentos

O tratamento proposto consistiu na aplicação do tricresol formalina pela técnica preconizada por Buckley<sup>4</sup> (1906) - e utilizada na prática clínica até os dias atuais.

Para padronização, foram utilizadas mechas de algodão estéreis (autoclavagem a 134°C, ciclo 6, durante 1 hora) compatíveis com o “batente cervical” confeccionado embebidas em 20 microlitros de tricresol formalina (Iodontosul, Brasil) com auxílio de uma pipeta eletrônica (BioPet, Brasil). O conjunto teve o excesso de substância removida com auxílio de gaze estéril até que não apresentasse qualquer marcação em papel absorvente de dimensão 20 milímetros de largura por 20 milímetros de comprimento, estimando-se um volume final de solução de 5 microlitros, o qual é reportado como não tóxico aos tecidos periapicais nas condições de uso em estudo prévio realizado por Wesley et al<sup>41</sup> (1970).

A mecha de algodão contendo o tratamento foi colocada na embocadura do canal radicular ao nível da porção mais apical do “batente cervical”, sendo imediatamente selado em sua extremidade superior com uma camada de 1 milímetro de comprimento de cimento a base de óxido de zinco (CaiTHEC, Brasil) e, em seguida, com uma camada de 3 milímetros de comprimento de cimento a base de ionômero de vidro (DFL, Brasil) sob protocolo de aplicação recomendado pelo fabricante.

Imediatamente após, os espécimes foram posicionados conforme descrito acima e imersos no meio de cultura. Após, foram mantidos incubados, pelos períodos teste, em uma incubadora umidificada a 95% ar/5% CO<sub>2</sub> em 37°C.

O meio de cultura contendo as células foi utilizado como controle negativo e o meio de cultura adicionando 100 mM de peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo.

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados pelo teste de variância (ANOVA) de 1 via, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $\alpha=0,05$ ). As análises foram realizadas no programa SPSS Statistic 18 Software (SPSS, Illinois, Estados Unidos).

## 4 RESULTADOS

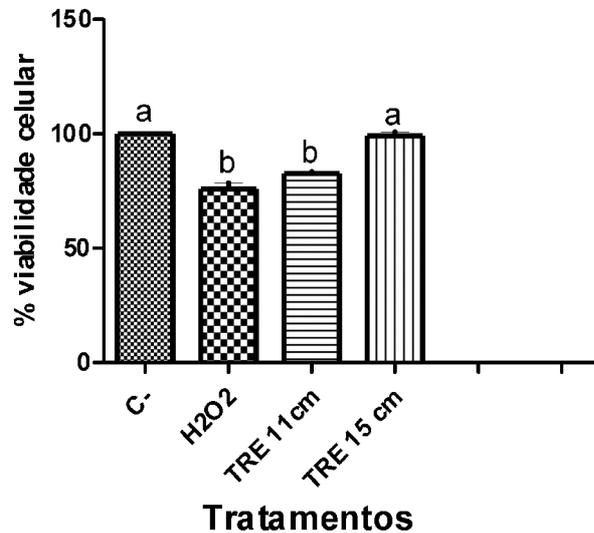
Foram realizados testes de cito e genotoxicidade *in vitro*, onde foram avaliados a citotoxicidade pelos testes: MTT, peroxidação lipídica (TBARS), carbonilação de proteínas e teste cometa para verificação de genotoxicidade do composto. Os resultados obtidos estão expressos através das figuras 3 a 10.

O tricresol formalina, em 24 horas de incubação, diminuiu significativamente a viabilidade celular para 82,73% na distância de 11 milímetros, enquanto que não foi considerado citotóxico na distância de 15 milímetros onde manteve 99,07% de viabilidade celular após tratamento ( $P < 0,05$ ) (figura 3). No período de 72 horas de incubação, ambas as distâncias diminuíram significativamente a viabilidade celular para 56,23% e 58,87% em 11 e 15 milímetros, respectivamente ( $P < 0,05$ ) (figura 4).

Em nenhuma distância ou período de incubação o tricresol formalina apresentou alterações nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) ou carbonilação de proteínas (figuras 5-8). Os resultados de ambos os ensaios foram considerados significantes ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle negativo.

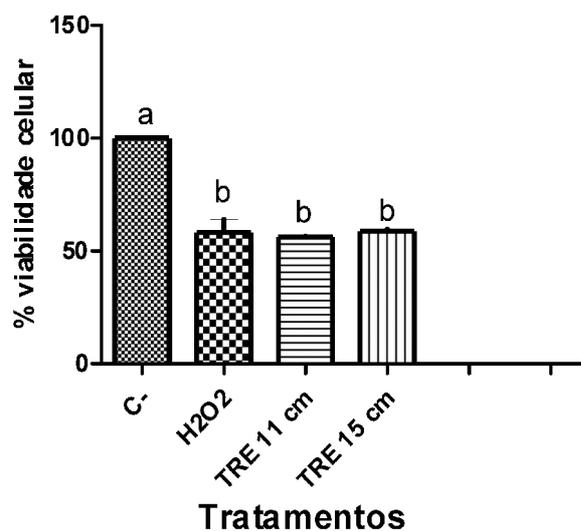
Em 24 horas de incubação, o tricresol formalina não causou danos no DNA em CMSP em ambas as distâncias verificadas no teste cometa ( $P < 0,05$ ) (figura 9). Porém, em 72 horas de incubação, os ensaios revelaram que o composto, tanto em 11 quanto em 15 milímetros de distância, apresentou índice de dano de DNA considerado significativo ( $P < 0,05$ ) (figura 10).

Figura 3 – Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) com 24 horas de incubação



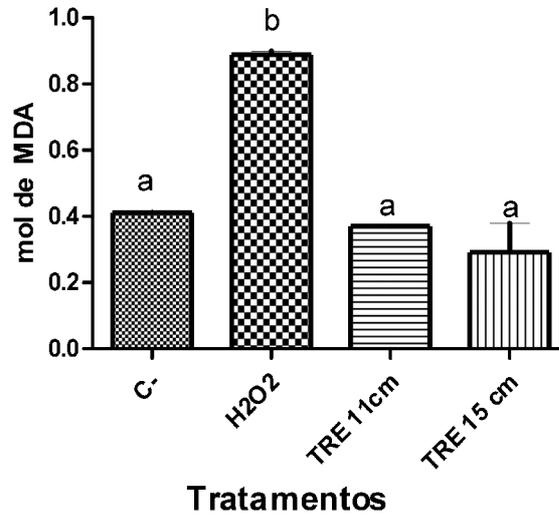
Ensaio MTT com 24 h de incubação. Resultados expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 4 – Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) com 72 horas de incubação



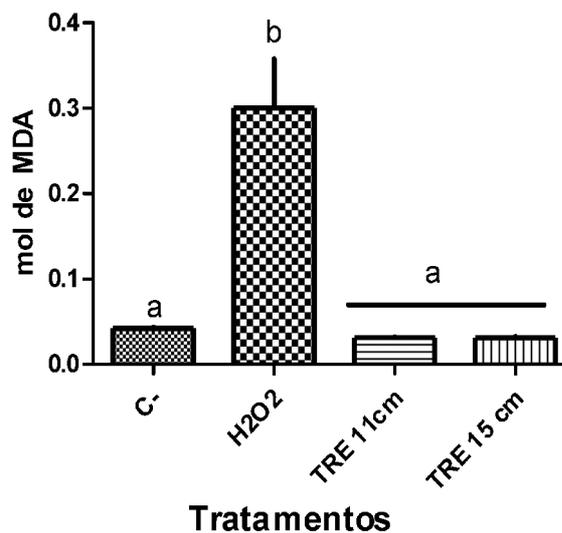
Ensaio MTT com 72 h de incubação. Resultados expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 5 – Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS) em 24 horas de incubação



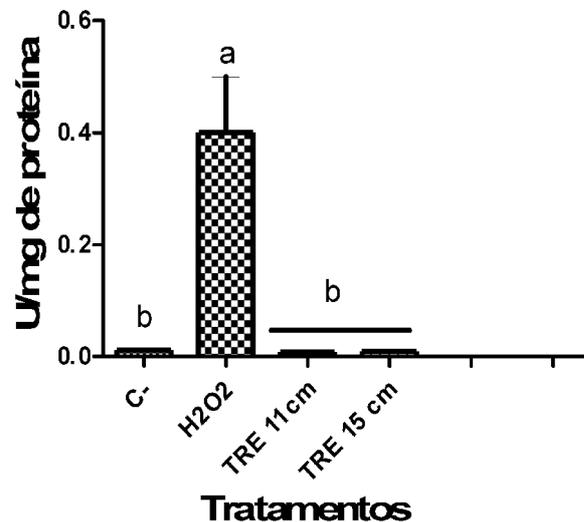
Ensaio TBARS com 24 h de incubação. Resultados expressos em mol de MDA. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 6 – Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS) em 72 horas de incubação



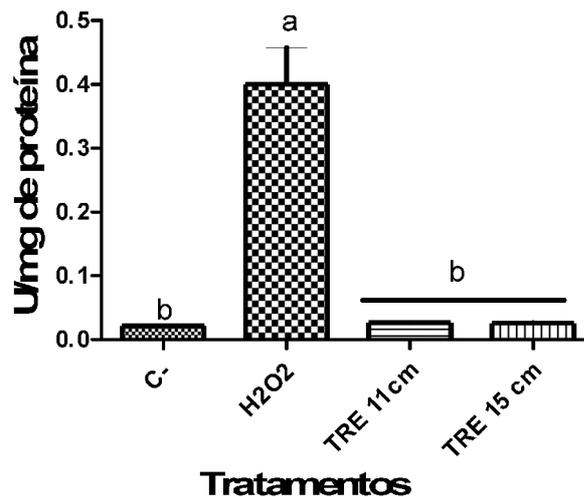
Ensaio TBARS com 72 h de incubação. Resultados expressos em mol de MDA. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 7 – Ensaio de Carbonilação de Proteínas em 24 horas de incubação



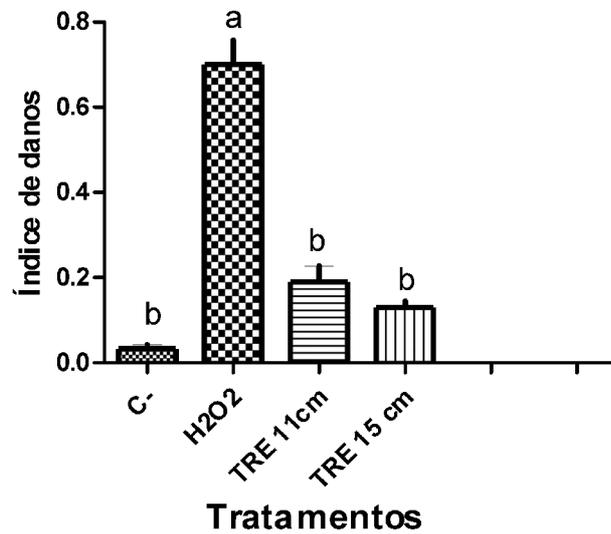
Ensaio carbonilação de proteínas com 24 h de incubação. Resultados expressos em unidades por mg de proteínas. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com  $H_2O_2$ . Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 8 – Ensaio de Carbonilação de Proteínas em 72 horas de incubação



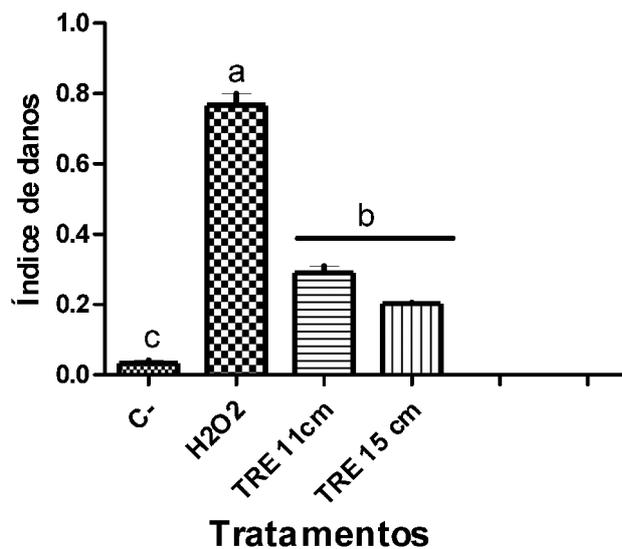
Ensaio carbonilação de proteínas com 72 h de incubação. Resultados expressos em unidades por mg de proteínas. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com  $H_2O_2$ . Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 9 – Ensaio Teste Cometa em 24 horas de incubação



Ensaio cometa com 24 h de incubação. Resultados expressos em índice de danos de DNA. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 10 – Ensaio Teste Cometa em 72 horas de incubação



Ensaio cometa com 72 h de incubação. Resultados expressos em índice de danos de DNA. Controle negativo (C-): células em meio de cultura; Controle positivo (C+): células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados expressos com média ± desvio padrão (D.P.) As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 DISCUSSÃO

O tricresol formalina é utilizado em endodontia desde o século XX<sup>31,34</sup> e é indicado em casos de necrose pulpar com presença de lesão periapical e em procedimentos de urgência<sup>17</sup>. Estudos têm sido realizados a respeito deste medicamento e seus componentes, porém ainda existe controvérsia quanto a sua compatibilidade biológica nas condições de uso clínico<sup>10, 13, 22, 38</sup>.

Soluções a base de formaldeído, como o tricresol formalina, tem sido relatados como potenciais soluções cito e genotóxicas devido a liberação de substâncias pela sua vaporização<sup>31,37</sup>. Nenhum experimento é capaz de determinar a resposta biológica real dos biomateriais<sup>11, 15</sup>, porém, apesar das suas limitações, testes laboratoriais são adequados para verificar mecanismos envolvidos na biocompatibilidade<sup>15</sup>. Portanto, este estudo realizou quatro testes *in vitro* relacionados a compatibilidade biológica, fornecendo dados a cerca da segurança na utilização do tricresol formalina como medicação intracanal.

As células utilizadas foram as células mononucleadas de sangue periférico (linfócitos e monócitos). As CMSP são aplicadas há décadas em estudos de cito e genotoxicidade, uma vez que são biomarcadoras de danos primários<sup>6, 18</sup>. Além disso, considerando que soluções utilizadas como medicação intracanal podem ser difundidas pela corrente sanguínea ao penetrar nos túbulos dentinários, periodonto e ramificações do sistema de canais radiculares<sup>1, 39, 40</sup>, estas células são capazes de representar os danos que essas drogas podem causar ao ser humano.

O teste MTT é um ensaio que expressa citotoxicidade de biomateriais através da mensuração da viabilidade celular de uma amostra<sup>6</sup>. A viabilidade celular foi verificada expondo as CMSP em cultura distante 11 e 15 milímetros à solução testada por períodos de 24 e 72 horas. Nossos achados mostram que o tricresol formalina não apresentou citotoxicidade significativa apenas na distância de 15 milímetros do meio de cultura e em um período de incubação de 24 horas. Nos demais parâmetros, o medicamento apresentou citotoxicidade significativa ( $P < 0,05$ ). Entretanto, o teste MTT não pode ser considerado isoladamente como parâmetro para definir se um material é biocompatível ou não, uma vez que representa apenas um aspecto da compatibilidade biológica<sup>25</sup>. Os dados encontrados podem ser justificados pela presença do formaldeído – componente do tricresol formalina – e sua liberação na forma de

vapor, o qual é considerado um material citotóxico e mutagênico, apresentando citotoxicidade significativa em estudos prévios que utilizaram linfócitos e células do ovário de hamsters chineses (células CHO)<sup>10, 13, 22</sup>.

Peroxidação lipídica é o dano a membrana celular resultante do estresse oxidativo<sup>33</sup>. O teste de indução de estresse oxidativo (TBARS) é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição de hidroperóxidos. No teste TBARS, o tricresol formalina não alterou os níveis de peroxidação lipídica em ambos os períodos de incubação e distâncias ( $P < 0,05$ ). Esse dado contrasta com os resultados do teste MTT. Isso pode ser explicado pelo reparo no balanço das reações de oxidação e redução e os danos nas camadas lipídicas não serem suficientes para causar morte celular, afetando somente o mecanismo biológico das células.

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina como previamente descrito por Levine et al<sup>16</sup> (1990). Nossos resultados apontaram que não houve alteração significativa nos níveis de carbonilação proteica ( $P < 0,05$ ). Os achados sugerem que o tricresol formalina, nessa metodologia, não gerou dano suficiente para causar morte celular devido ao aumento de radicais livres no meio pelo aumento nos níveis de carbonilação de proteínas. Na literatura não foram encontrados estudos sobre o tricresol formalina ou seus componentes que avaliassem o estresse oxidativo em proteínas ou lipídeos nas condições propostas pela metodologia aplicada neste estudo.

O teste cometa é um método padrão de avaliação de dano em DNA de simples execução e alta sensibilidade<sup>9</sup>. Testes de genotoxicidade são essenciais para obtermos dados sobre dano genético e podem ser importantes indicadores de carcinogênese, pois esses testes são capazes de mensurar um processo tumoral inicial<sup>29</sup>. Neste estudo, não foi registrado danos de DNA pela solução testada nas distâncias de 11 e 15 milímetros em 24 horas de incubação ( $P < 0,05$ ). Após 72 horas, o tricresol formalina foi capaz de gerar danos de DNA em CMSP em ambas as distâncias pelo teste cometa ( $P < 0,05$ ). Nossos dados após 24 horas corroboram os resultados encontrados em estudos prévios realizados por Ribeiro (2004 e 2006)<sup>30, 31</sup>, Nishimura (2008)<sup>23</sup> e Ramos (2008)<sup>27</sup>. Especificamente os dados mensurados após 72 horas, mostram que o tricresol formalina pode induzir danos de DNA, reforçando a recomendação de Bernabé et al<sup>2</sup> (1972), que avaliou histologicamente as respostas dos tecidos periapicais ao tricresol formalina em cães e concluiu que o composto não é indicado a permanecer na câmara pulpar por mais de dois dias.

Testes *in vitro*, são essenciais para entendermos efeitos de biomateriais utilizados amplamente em Odontologia. Embora tenham grande sensibilidade e serem marcadores importantes para a conduta clínica, eles são limitados em simular as condições de uso dos materiais testados. No corpo humano, os efeitos cito e genotóxicos podem se apresentar de forma distinta, uma vez que as células possuem capacidade reparadora, o substrato em que a medicação intracanal é aplicada apresenta-se colonizado por bactérias e outros organismos e a difusão de vapores pelos tecidos periapicais pode ocorrer de forma bastante diferente a em um meio de cultura celular<sup>3, 26, 40</sup>. Acrescenta-se que Mohorn et al<sup>21</sup> (1971) verificou que o efeito da pressão positiva e negativa na região periapical de um dente necrosado pode realizar um efeito no movimento da droga pelo sistema de canais radiculares e forame apical.

Além disso, seres humanos produzem formaldeído endógeno como parte do seu metabolismo celular. As células humanas são equipadas para lidar com essa exposição através de múltiplos mecanismos de oxidação, visando incorporá-lo como uma macromolécula biológica<sup>20</sup>. É necessário, portanto, trabalhos *in vitro* e *in vivo* em animais adicionais que reproduzam as condições de uso clínico de substâncias a base de formaldeído e possam verificar, além dos efeitos tóxicos do composto, os efeitos reparadores das células pós-tratamento.

## **6 CONCLUSÃO**

Este estudo realizou quatro testes *in vitro* relacionados a compatibilidade biológica, fornecendo dados a cerca da segurança na utilização do tricresol formalina como medicação intracanal. Concluimos que o tricresol formalina não apresentou citotoxicidade significativa em 24 horas de incubação a uma distância de 15 milímetros do meio de cultura. Nos demais parâmetros de tempo e distância foi significativamente citotóxico. Em 24 horas de incubação, não foram registrados danos de DNA pela solução testada. Após 72 horas o tricresol formalina foi capaz de gerar danos de DNA em CMSP.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTELSTONE, H. J. **Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland.** Journal of Dental Research, v. 30, p. 738-733, 1951
2. BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R.; SOUZA, V. **Resposta dos tecidos periapicais ao tricresol formalina: estudo histológico em cães.** Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 45-51, 1972
3. BOTTON, G. et al. **Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth.** International Endodontic Journal, v. 49, p. 746-754, 2016
4. BUCKLEY, J. P. **A rational treatment for putrescent pulps.** Dent Cosmos, Philadelphia, n. 48, p. 537-543, 1906
5. CAMARGO, H. A.; RIBEIRO, J. F. **Correlação entre comprimento da coroa total do dente em incisivos, caninos e pré-molares superiores e inferiores.** Revista Odonto UNESP, São Paulo, v. 20, p. 217-225, 1991
6. CIAPETTI, G.; PRATELLI, L.; PIZZOFERRATO, A. **In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay.** Biomaterials, v. 14, p. 359-364, 1983
7. DE SOUZA, V. **Emprego de medicamentos no interior dos canais radiculares: ação tópica e à distância de algumas drogas.** ARS Cvrandi em Odontologia, sept. 1978
8. FRONZA, A. B. Et al. **Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos jovens.** 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.
9. GARCÍA, O. et al. **Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining.** Mutation Research, v. 556, n. 1-2, p. 25-34, nov. 2004.
10. GOLDMACHER, V. S.; THILLY, W. G. **Formaldehyde is mutagenic for cultured human cells.** Elsevier Biomedical Press, n. 116, p. 417-422, 1983
11. HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. **Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review part 1. Intracanal drugs and substances.** International Endodontic Journal. v. 36, p. 75-85, 2003
12. HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. **Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review part 1. Intracanal drugs and substances.** International Endodontic Journal. v. 36, p. 75-85, 2003

13. KREIGER, R. A.; GARRY, V. F. **Formaldehyde-induced cytotoxicity and sister-chromatid exchanges in human lymphocytes cultures.** Elsevier Biomedical Press, n. 120, p. 51-55, 1983
14. LEITE, A. C. G. L. et al. **Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth.** Elsevier Biomedical Press, n. 747, p. 93-97, 201210523
15. LEIRSKAR, J.; HELGELAND, K. **Mechanism of toxicity of dental materials.** International Endodontic Journal, v. 14, p. 42-47, 1981
16. LEVINE R.L et al. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** Meth. Enzymol, n.186, p. 464-478, 1990.
17. LOPES, H. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. **Medicação Intracanal.** In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.F. **Endodontia Biologia e Técnica.** 2º ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A., p. 581-645, 2004
18. MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana.** Grupo A, 2011.
19. MENEZES, M. M. et al. **In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals.** International Endodontic Journal, n. 37, p. 311-319, 2004
20. MILNES, A. R. **Is formocresol obsolete?** A fresh look at the evidence concernig safety issues. Peadiatric Dentistry, v. 30, n. 3, may./ jun. 2008
21. MOHORN, H. W.; DOWSON, J.; BLANKENSHIP, J. R. **Odontic periapical pressure followinf vital pulp extirpation.** Oral Surg, v. 31, p. 536-544, 1971
22. NATARAJAN, A. T. et al. **Evaluation of the mutagenicity of formaldehyde in mamalian cytogenetic assays in vivo and vitro.** Elsevier Biomedical Press, n. 120, p. 355-360, 1983
23. NISHIMURA, H. et al. **Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromossomal aberrations in human dental pulp cells.** Mutation Research, v. 649, p. 45-53, 2008
24. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Analytical Biochemistry, v.95, p.351-358, 1979.
25. PETERS, O. A. **Research that matters:** biocompatibilty and cytotoxicity screening. International Endodontic Journal. v. 46, p. 195-197, 2013
26. PIRES, C. W. et al. **Induction of citotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth.** International Endodontic Journal, v. 49, p. 737-745, 2016

27. RAMOS, M. E. S. P. et al. **Evaluation of mutagenic effects of formocresol: detection of DNA-protein cross-links and micronucleus in mouse bone marrow.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 105, n. 3, p. 398-404, 2008
28. RANLY, D. **Formocresol toxicity: current knowledge.** Acta Odontol Pediatr, n. 5, p. 93-98, 1984
29. RIBEIRO, D. A. **Do endodontic compounds induce genetic damage?** A comprehensive review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 105, n. 2, p. 251-256, feb. 2008
30. RIBEIRO, D. A.; MARQUES, M. E. A.; SALVADORI, D. M. F. **Antimicrobial endodontic compounds do not modulate alkylation-induced genotoxicity and oxidative stress in vitro.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 102, n. 2, p. 32-36, aug. 2006
31. RIBEIRO, D. A.; MARQUES, M. E. A.; SALVADORI, D. M. F. **Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay.** Journal of Endodontics, v. 30, n. 8, p. 593-596, aug. 2004
32. ROSA, O. P. S. et al. **In vitro effect of intracanal medicaments on strict anaerobes by means of the broth dilution method.** Pesqui Odontol Bras, v. 16, n. 1, p. 31-36, jan./mar. 2002
33. SAGHIRI, M. A.; DELVARANI, A.; MEHRVARZ FAR, P. **The impact of pH on cytotoxicity effects of three root canals irrigants.** The Saudi Dental Journal, v. 23, p. 149-152, 2011
34. SILVA, E. J. N. L. et al. **Antimicrobial evaluation of vapors of paramonochlorophenol and tricresol formalin using a new methodology.** Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro, v. 69, n. 2, p 255-257, jul./dez. 2012
35. SINGH, N. P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp. Cell Res, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar. 1988
36. SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P.; UZEDA, M. **Atividade antibacteriana de medicamentos endodônticos sobre bactérias anaeróbias estritas.** Rev Assoc Paul Cir Dent, v.50, n. 4, p.326-331, 1996
37. TAI, K. W. et al. **Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide-eugenol based rootcanal sealers user an in vitro mammalian test system.** J Biomed Mater Res, v. 59, p. 73-77, 2002
38. THOMAS, M. I. et al. **Formaldehyde in dentistry: antimicrobial, carcinogenic and mutagenic aspects. A study of its viability in dentistry.** Revista Odonto Ciência, Faculdade de Odontologia/PUCRS, v. 21, n. 54, out./dez. 2006

39. TUCKER, M. J. **The systemic toxicity evaluation of dental materials.** International Endodontic Journal, v. 14, p. 49-52, 1981
40. VANDER WALL, G. L. et al. **Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs.** Oral Surg, v. 2, n. 33, p. 230-241, feb. 1972
41. WESLEY, D. J.; MARSHALL, F. J.; ROSEN, S. **The quantitation of formocresol as a root canal medicament.** Oral Surg, v. 29, p. 603-612, 1970
42. WILMS, L. C. et al. **Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes.** Mutation Research, v.582, n.1-2, p.155-162, 2005.

## APÊNDICE A – TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA

### APÊNDICE A – TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA

Ao responsável pelo Departamento de Estomatologia  
Prof. Walter Blaya Perez

Dirigimo-nos a V.Sa. a fim de solicitar autorização para a realização da pesquisa “Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico”, do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria, nas dependências do Departamento de Estomatologia.

A pesquisa será executada pelo acadêmico Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro e supervisionada pela Prof.ª Dr.ª Márcia da Silva Schmitz, na qual será avaliada a biocompatibilidade da medicação intracanal de tricresol formalina aplicada em diferentes comprimentos de canais radiculares em diferentes períodos de tempo.

Os dentes utilizados nesta pesquisa serão provenientes do Banco de Dentes Permanentes Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (BDPH-UFSM) (documentação anexa), obedecendo os critérios de inclusão e exclusão.

Os benefícios com a colaboração do Departamento de Estomatologia, através da autorização para a utilização das suas dependências, envolvem a verificação da biocompatibilidade e dos possíveis danos do tricresol formalina na prática diária da endodontia, pela técnica de utilização preconizada por Buckley, em 1904, trazendo clareza quanto aos benefícios e riscos do uso da substância enquanto medicação intracanal e sendo os achados da nossa pesquisa, potenciais indicadores para a prática clínica da especialidade, oferecendo tratamento adequado aos pacientes e informação útil a comunidade científica.

Não haverão riscos para o departamento com a realização da pesquisa, pois todas as normas estipuladas para sua utilização serão seguidas, preservando assim a sua estrutura e equipamentos.

As informações obtidas serão utilizadas em publicações e eventos científicos. A equipe do projeto compromete-se de que não serão divulgados dados ou informações que possam identificar o paciente participante da pesquisa ou profissionais que trabalham na clínica.

Este projeto não implicará em custos materiais para a instituição, sendo financiado pelos pesquisadores. Fica reservado o direito de cancelar sua autorização a qualquer momento.

Santa Maria, 17 de Agosto de 2016

No aguardo de sua manifestação e agradecendo antecipadamente, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr.ª Márcia da Silva Schmitz  
Pesquisadora Responsável

Autorizamos a realização da pesquisa "Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico" nas dependências do Departamento de Estomatologia do curso de Odontologia da UFSM.

Santa Maria, 17 de agosto de 2016

  
Prof. Walter Blaya Perez

Responsável pelo Departamento de Estomatologia

Walter Blaya Perez  
-Chefe Dept.º Estomatologia

## APÊNDICE B – TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

### APÊNDICE B – TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA

Ao coordenador do curso de Odontologia da UFSM  
Prof. Dr. Renésio Armindo Grehs

Dirigimo-nos a V.Sa. a fim de solicitar autorização para a realização da pesquisa “Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico”, do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria, nas dependências do Departamento de Estomatologia.

A pesquisa será executada pelo acadêmico Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro supervisionada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia da Silva Schmitz, na qual será avaliada a biocompatibilidade da medicação intracanal de tricresol formalina aplicada em diferentes comprimentos de canais radiculares em diferentes períodos de tempo.

Os dentes utilizados nesta pesquisa serão provenientes do Banco de Dentes Permanentes Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (BDPH-UFSM) (documentação anexa), obedecendo os critérios de inclusão e exclusão.

Os benefícios com a colaboração do Departamento de Estomatologia, através da autorização para a utilização das suas dependências, envolvem a verificação da biocompatibilidade e dos possíveis danos do tricresol formalina na prática diária da endodontia, pela técnica de utilização preconizada por Buckley, em 1904, trazendo clareza quanto aos benefícios e riscos do uso da substância enquanto medicação intracanal e sendo os achados da nossa pesquisa, potenciais indicadores para a prática clínica da especialidade, oferecendo tratamento adequado aos pacientes e informação útil a comunidade científica.

Não haverão riscos para o departamento com a realização da pesquisa, pois todas as normas estipuladas para sua utilização serão seguidas, preservando assim a sua estrutura e equipamentos.

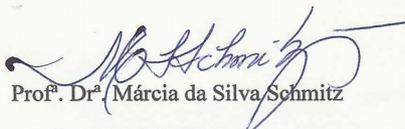
As informações obtidas serão utilizadas em publicações e eventos científicos. A equipe do projeto compromete-se de que não serão divulgados dados ou informações que possam identificar o paciente participante da pesquisa ou profissionais que trabalham na clínica.

Este projeto não implicará em custos materiais para a instituição, sendo financiado pelos pesquisadores. Fica reservado o direito de cancelar sua autorização a qualquer momento.

Santa Maria, 16 de Agosto de 2016.

No aguardo de sua manifestação e agradecendo antecipadamente, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Márcia da Silva Schmitz

Pesquisadora Responsável

Autorizamos a realização da pesquisa “Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico” nas dependências do Departamento de Estomatologia do curso de Odontologia da UFSM.

Santa Maria, 16 de Agosto de 2016.



Prof. Dr. Renésio Armino Grehs

Coordenador do Curso de Odontologia – UFSM

PROF. RENÉSIO ARMINDO GREHS  
Coordenador do Curso de Odontologia  
Centro de Ciências da Saúde/UFSM  
SIAPE 2046724

## APÊNDICE C – DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES PERMANENTES HUMANOS (BDPH-UFSM) AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Odontologia Restauradora

### DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o Banco de Dentes Permanentes Humanos da Universidade Federal de Santa Maria compromete-se a auxiliar pesquisadores na realização de seus projetos.

Sendo assim, após aprovação do CEP, nossa contribuição consistirá no oferecimento de 18 dentes para a execução do trabalho de pesquisa intitulado “Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico” realizado por Carlos Eduardo Victor da Costa Ribeiro e orientado por Márcia da Silva Schmitz.

Santa Maria, 18 de agosto de 20 16

Assinatura do Coordenador

Prof. Dr. Jeferson C. Marchion  
SIAPE - 1048002  
Coordenador

**APÊNDICE D – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE****APÊNDICE D – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA

**Título do projeto:** Biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico

**Pesquisador Responsável:** Profª. Drª. Márcia da Silva Schmitz

**Instituição/departamento:** Universidade Federal de Santa Maria / Departamento de Estomatologia

**Telefone para contato:** (55) 8447-7922 ou (55) 9663-1194

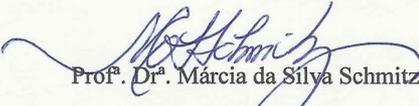
**Local de coleta de dados:** Departamento de Estomatologia – UFSM e Laboratório de Cultura Celular – UNIFRA

**Endereço dos locais da coleta:** UFSM – Rua Floriano Peixoto, 1184, 7º andar, Centro, Santa Maria, RS.

UNIFRA – Rua dos Andradas, 1614, prédio 04, sala 11, Centro, Santa Maria, RS.

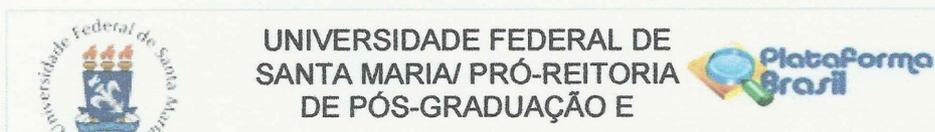
Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar os dados coletados a partir de dentes humanos cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da UFSM, durante o período de 11 meses, sendo que após isso serão publicados. Concordam igualmente que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto de pesquisa. As informações somente serão divulgadas de forma anônima e serão mantidas em arquivo próprio nas dependências da Clínica de Ontologia da disciplina de Endodontia do curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria até a publicação dos achados em revista científica. Todos os dados coletados ficarão sob a responsabilidade da Professora Doutora Márcia da Silva Schmitz (pesquisadora responsável).

Santa Maria, 18 de agosto de 2016.

  
Profª. Drª. Márcia da Silva Schmitz

Pesquisadora Responsável

## APÊNDICE E – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** BIOCMPATIBILIDADE DO TRICRESOL FORMALINA ATRAVÉS DE TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE

**Pesquisador:** Marcia da Silva Schmitz

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 61012816.1.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

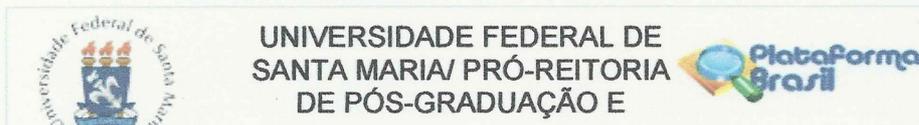
**Número do Parecer:** 1.812.385

#### Apresentação do Projeto:

Ainda nos dias atuais, as técnicas e soluções irrigadoras não mostram evidências de uma completa desinfecção do sistema canais radiculares nos casos de necrose pulpar, onde, alguns autores recomendam o uso de medicação intra-canal entre sessões. A literatura mostra controvérsia quanto a biocompatibilidade destes medicamentos a base de formaldeído, sendo que estudos de avaliação da citotoxicidade utilizando culturas de células mononucleadas de sangue periférico não apresentam convergência de resultados quanto ao efeito citotóxico das citadas soluções.

O estudo propões estudar a biocompatibilidade do tricresol formalina através de testes de citogenotoxicidade em células mononucleadas de sangue periférico com uma metodologia ex vivo, que procura se assemelhar a utilização deste medicamento na prática clínica. Serão utilizados 18 incisivos inferiores permanentes humanos, doados pelo Banco de Dentes Permanentes Humanos da Odontologia da UFSM. Após a abertura e preparo endodôntico nos comprimentos radiculares de 11 e 15 milímetros, será aplicada uma medicação intracanal de tricresol formalina no interior da câmara pulpar, selado a cavidade e posicionado o elemento dentário sobre um poço de cultura de linfócitos e monócitos por períodos de 24, 48 e 72 horas.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
Bairro: Camobi CEP: 97.105-970  
UF: RS Município: SANTA MARIA  
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.812.385

As amostras de sangue periférico serão obtidas através de três amostras de descarte do Laboratório Escola de Análises Clínicas do Centro Universitário Franciscano, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da instituição (CAAE:

31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação. As amostras serão obtidas através de punção venosa utilizando tubos com heparina tipo Vacutainer®, as quais serão utilizadas para separar as CMSP e posteriores tratamentos e culturas celular.

Serão realizados os testes de MTT, LDH, Hemólise, catalase, peroxidação lipídica (TBARS), NPSH, carbonilação de proteínas e teste cometa para verificação de genotoxicidade das suspensões.

Os resultados obtidos serão tabulados e submetidos a cálculos estatísticos apropriados através do Programa SPSS Statistic 18 Software (SPSS, Illinois, Estados Unidos). O nível de significância estatística será estabelecido em 5% ( $=0,05$ ).

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO GERAL:** avaliar ex vivo a biocompatibilidade do tricresol formalina como medição intracanal nas condições de uso preconizadas por Buckley em cultura de células mononucleadas de sangue periférico

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Comparar se há diferença no efeito citotóxico do tricresol formalina quando distante 11 milímetros e 15 milímetros do meio de cultura;

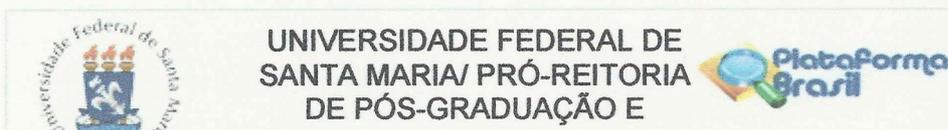
Avaliar o efeito citotóxico do tricresol formalina sobre o meio de cultura após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:** os dentes humanos extraídos serão obtidos no Banco de Dentes Permanentes Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (BDPH-UFSM), com risco mínimo de impossibilidade de recuperar o dente íntegro após o início da pesquisa, sendo preservada toda e qualquer forma de identificação dos doadores ao Banco de Dentes Permanentes Humanos.

**BENEFÍCIOS:** indiretos através do conhecimentos gerado.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970  
 UF: RS Município: SANTA MARIA  
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.812.385

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta folha de rosto, registro do projeto, autorizações institucionais, termo de confidencialidade, devidamente redigidos e assinados.

**Recomendações:**

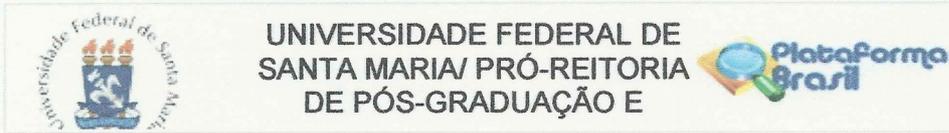
Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. **ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_784055.pdf	07/10/2016 18:06:14		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Comprovante_registro_GAP.pdf	07/10/2016 18:04:38	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_pesquisadores.pdf	07/10/2016 18:00:29	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao_CEP.pdf	07/09/2016 19:18:32	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	07/09/2016 19:16:12	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Declaração de Instituição e	Termo_departamento_estomato.pdf	07/09/2016 19:05:07	Marcia da Silva Schmitz	Aceito

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970  
 UF: RS Município: SANTA MARIA  
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.812.385

Infraestrutura	Termo_departamento_estomato.pdf	07/09/2016 19:05:07	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	07/09/2016 19:02:35	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_institucional.pdf	07/09/2016 18:55:51	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/09/2016 18:54:30	Marcia da Silva Schmitz	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/09/2016 18:53:37	Marcia da Silva Schmitz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 09 de Novembro de 2016

Assinado por:  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
 (Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970  
 UF: RS Município: SANTA MARIA  
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com