

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES
CITOTÓXICOS POR CMSP TRATADAS COM PASTAS
ENDODÔNTICAS INDICADAS PARA DENTES
DECÍDUOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Brenda Lanza Nakashima

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES CITOTÓXICOS
POR CMSP TRATADAS COM PASTAS ENDODÔNTICAS
INDICADAS PARA DENTES DECÍDUOS**

Brenda Lanza Nakashima

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, Ênfase em Odontopediatria, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana Rodrigues Praetzel

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lanza Nakashima, Brenda
EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES CITOTÓXICOS POR CMSP
TRATADAS COM PASTAS ENDODÔNTICAS INDICADAS PARA DENTES
DECÍDUOS / Brenda Lanza Nakashima.-2015.
58 p. ; 30cm

Orientador: Juliana Rodrigues Praetzel
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2015

1. Materiais Restauradores do Canal Radicular 2.
Dente Decíduo 3. Reação em cadeia de polimerase em tempo
real 4. Expressão Gênica 5. Toxicidade. I. Rodrigues
Praetzel, Juliana II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES CITOTÓXICOS POR
CMSP TRATADAS COM PASTAS ENDODÔNTICAS INDICADAS
PARA DENTES DECÍDUOS**

elaborada por
Brenda Lanza Nakashima

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Juliana Rodrigues Praetzel, Dra.
(Presidente/Orientadora – UFSM)

Michele Rorato Sagrillo, Dra. (UNIFRA)

Marta Dutra Machado Oliveira, Dra.(UFSM)

Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amores, meu esposo Rafael e minha filha Rafaela, pelo apoio e motivação prestado. Ao meu pai Almeri e minha mãe Eloni, pelo amor, exemplo, e pela fé a mim deixados. À minha irmã Bruna, aos meus amados sobrinhos Elena e Miguel e meu cunhado Junior, por estarem ao meu lado e me fazerem feliz. À minha sogra Vernilga, meu sogro Mário e cunhado Gustavo, pela presença e ajuda diária em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por seu amor incondicional, por não olhar para minhas limitações e falhas e me sustentar a cada dia. À ti toda honra e louvor!!!

À **coordenação e professores** do Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas da pelos exemplos de dedicação deixados a mim.

Aos professores da Odontopediatria, em especial a **Martinha**, pela seriedade no ensino e exercício da Odontologia, sem deixar de lado a alegria como manifestação do amor pelo trabalho.

À minha orientadora **Juliana**, pelos anos em que caminhamos juntas e nos quais pude aprender ensinamentos que levarei para toda vida. Ensinamentos esses que vão além do conhecimento científico. Agradeço e destaco seu empenho e dedicação demonstrados nesses dois anos de estudo e certamente refletidos também neste trabalho graças ao seu potencial.

Aos colaboradores, professora **Michele Rorato Sagrillo** e professor **Rodrigo de Almeida Vaucher**, pela seriedade e disposição com que fazem seus experimentos e executam as pesquisas. Às horas dedicadas para este trabalho e às dúvidas esclarecidas, meu muito obrigada.

Às funcionárias da Odontopediatria, pela amizade e disposição nos momentos em que precisei.

Aos colegas da Odontopediatria, **Bruna Antoniazzi**, **Bernardo Agostini**, **Janessa Engelmann**, **Yásmín Ramadan**, **Fernanda Tomazoni** e **Gabriel Nicoloso**, em especial aos amigos e colegas, **Carine W. Pires** e **Graziela Botton** pelas incontáveis vezes em que precisei de suas ajudas e de seus conhecimentos - sobretudo das palavras amigas e de suas companhias!! Ao **Bruno Emanuelli**, por partilhar sua sabedoria durante as disciplinas do curso, com seu dom de tornar simples o complexo, a **Flávia Vieira**, pelos momentos de aula, seminários, congresso, bate-papos deliciosos, por sua risada e alegria!!!

Ao Centro Universitário Franciscano - **UNIFRA** – pela parceria realizada neste trabalho, por disponibilizar seus laboratórios, Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC), de Cultura Celular e de Biologia Molecular para execução dos testes e ensaios propostos neste estudo; em especial, aos funcionários **Kátia** e **Gerson**, pela competência demonstrada em suas atitudes de trabalho e pela alegria de suas companhias.

Aos alunos e amigos da Unifra, **Adriana Lima de Mello Borba**, **Christopher Pereira Posser**, **Diulle Spatt Peres**, **Gabriel**, **Mirian Ferrão Maciel**, **Hemilaine Silveira de Almeida**, pela acolhida, conversas, cafés e risadas, mas sobretudo pelos momentos de trabalho tão bem desempenhados por todos, serei eternamente grata e espero realizarmos mais experimentos!!!

Ao Grupo de Oração Santo Rosário, o qual me deixa mais perto de Deus através do convívio com irmãos e amigos. Obrigada por tudo!!!

“O Senhor é meu Pastor e nada
me faltará”

(Sl 26)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES CITOTÓXICOS POR CMSP TRATADAS COM PASTAS ENDODÔNTICAS INDICADAS PARA DENTES DECÍDUOS

AUTORA: BRENDA LANZA NAKASHIMA
ORIENTADORA: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

Pastas iodoformadas (PI) e a base de hidróxido de cálcio (PH) são empregadas na pulpectomia de dentes decíduos, complementando a ação antimicrobiana do preparo químico mecânico e favorecendo o reparo tecidual. Essas pastas ocupam e permanecem por um período de tempo ao longo do canal radicular, entrando em contato com a região periapical e tecidos adjacentes, tornando-se o objetivo deste estudo quantificar a expressão relativa de genes de toxicidade manifestados pelas pastas, de forma a avaliar a biocompatibilidade das mesmas. Pelo ensaio RT-PCR, foram analisados mecanismos celulares induzidos ou gerados por extratos das pastas endodônticas: PI com Nebacetin (PNEB); com Maxitrol (PMAX); com Clorexidina (PCHX); e Guedes-Pinto (PGP); e PH: Calen® espessada com Oxido de Zinco (Calen®/ZOE); e pasta de Hidróxido de Cálcio com Clorexidina (PHCHX); Ultracal®XS, frente às células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), de forma a quantificar a expressão gênica relativa dos mediadores citotóxicos: Granzima A, Granzima B, Granulisina e Perforina. Previamente à expressão gênica, para analisar aspectos da viabilidade celular, foram realizados ensaios – MTT, LDH e atividade de Caspases. Após teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os resultados foram tratados por ANOVA de uma via e Tukey, com $p < 0,05$. A PNEB foi a única pasta que expressou todos os mediadores citotóxicos avaliados ($p < 0,05$). Com relação à viabilidade celular, a PNEB apresentou aumento de Caspases 1 e 8 ($p < 0,05$); A PGP levou ao aumento das Caspases 1, 3 e 8 ($p < 0,05$); A PCHX diminuiu a viabilidade celular no MTT e LDH, além de apresentar aumento da atividade de todas as Caspases ($p < 0,05$). Nas PH, somente a Ultracal®XS apresentou valores de concentração significativos para Caspase 1, 3 e 8 ($p < 0,05$). Apesar da PNEB ter apresentado elevada expressão gênica relativa de todos os mediadores citotóxicos analisados, não causou diminuição da viabilidade celular, não ocasionando aumento da atividade da Caspase 3 (efetora da apoptose), demonstrando biocompatibilidade. Dentre as PI que apresentaram melhor biocompatibilidade sob o aspecto de citotoxicidade foram a PGP e PMAX. O material com potencial citotóxico verificado neste experimento foi a PCHX, pois diminuiu drasticamente a viabilidade celular, confirmada em dois ensaios e corroborada pela alta atividade de todas as Caspases analisadas, e ainda, devido à morte celular, a incapacidade de expressão gênica. Todas as PH desempenharam comportamento citocompatível, de acordo com os ensaios realizados e à luz da biologia molecular.

Palavras-chave: Expressão Gênica. Reação em cadeia de pomileraase em Tempo Real. Materiais Restauradores do Canal Radicular. Dente Decíduo. Toxicidade.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Dental Science
Federal University of Santa Maria

GENE EXPRESSION OF CYTOTOXIC MEDIATORS BY PBMC TREATED WITH ROOT CANAL FILLING MATERIALS FOR PRIMARY TEETH

AUTHOR: BRENDA LANZA NAKASHIMA
ADVISOR: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL
Defense Place and Date: Santa Maria, August 14, 2015.

Iodoform (PI) and calcium hydroxide- based pastes (PH) are used in pulpectomy of primary teeth, complementing the antimicrobial action of mechanical chemical preparation and promoting tissue repair. These pastes take up and stay for a period of time along the root canal by contacting the periapical region and surrounding tissue, making it the aim of this study to quantify the relative expression of toxicity genes expressed by pastes, evaluating the biocompatibility these materials. By RT-PCR assay, were analyzed cellular mechanisms induced or generated by extracts of endodontic pastes: PI with Nebacetin (PNEB); with Maxitrol (PMAX); chlorhexidine (PCHX); and Guedes Pinto (GP); and PH: Calen® thickened with zinc oxide (Calen®/ZO); and calcium hydroxide paste with Chlorhexidine (PHCHX); Ultracal®XS, using mononuclear cells from human peripheral blood (PBMC) , for to quantify the gene expression on the cytotoxic mediators: Granzyme A, Granzyme B, Granulysin and Perforin. Prior to gene expression, to analyze aspects of cell viability assays were performed - MTT, LDH and Caspases Activity. The results were analyzed by Kolmogorov-Smirnov, one-way ANOVA and Tukey test, with $p < 0.05$. The PNEB was the only one among all evaluated pastes that expressed all cytotoxic mediators above mentioned ($p < 0.05$). Reviewed in cell viability, increased by PNEB Caspases 1 and 8 ($p < 0.05$); The PGP increased Caspases 1, 3 and 8 ($p < 0.05$); The PCHX decreased cell viability MTT and LDH, and exhibit increased activity of all Caspases ($p < 0.05$). In PH, Ultracal®XS only presented significant concentration values for Caspase 1 , 3 and 8 ($p < 0.05$). Despite the PNEB have presented high relative gene expression of all cytotoxic mediators analyzed, not caused decrease in cell viability, not causing increased activity of Caspase 3 (effector of apoptosis), demonstrating biocompatibility. Among the PI that showed better biocompatibility under the aspect of cytotoxicity were the PGP and PMAX. The material with cytotoxic potential observed in this experiment was the PCHX as dramatically decreased cell viability, confirmed the two tests and supported by high activity of all the analyzed Caspases, and also due to cell death, the inability of gene expression. All pH played citocompatível behavior, according to tests performed in the light of molecular biology.

Keywords: Gene Expression. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Root Canal Filling Materials. Tooth Deciduous. Toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Calen/OZ - Pasta Calen® espessada com óxido de zinco
- CHX - Gel de gluconato de clorexidina 2%
- CMSP - Células mononucleadas do sangue periférico
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DNTP's - Dinucleotídeos
- HC - Hidróxido de cálcio
- LDH - Lactato Desidrogenase
- MAX - Pomada Maxitrol®
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
- NEB - Pomada Sulfato de Neomicina + Bacitracina
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PCHX- Pasta de hidróxido de cálcio + Gel de gluconato de clorexidina 2%
- PGP - Pasta Guedes-Pinto
- PH - Pastas à base de hidróxido de cálcio
- PI - Pastas iodoformadas
- PHCHX- Pasta de hidróxido de cálcio + Gel de gluconato de clorexidina 2%
- PMAX - Pasta Maxitrol®
- PMCC - Paramonoclorofenol canforado
- PNEB - Pasta Sulfato de Neomicina + Bacitracina
- RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute medium 1640
- RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- SUPERSCRIPT™ III PLATINUM ® - Sybr Green one-step qRT-PCR Kit with ROX,
Invitrogen™
- TRIZOL- Quick-Zol Trizol
- Ultracal - Pasta UltraCal®XS

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
1. ARTIGO	17
1.1 Resumo	19
1.2 Introdução.....	19
1.3 Materiais e Métodos	21
1.4 Resultados	28
1.5 Discussão	28
1.6 Conclusão	33
1.7 Referências	33
1.8 Figuras	39
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXOS	51
Anexo A – Carta de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	51
Anexo B – Normas para publicação no periódico <i>International Endodontic Journal</i>	54

INTRODUÇÃO GERAL

Dentes acometidos por lesões cariosas profundas e por trauma durante a infância, estão entre as causas mais comuns relacionadas a uma condição pulpar de inflamação irreversível ou de necrose (SBBRASIL, 2010). Nestes casos o tratamento indicado é a Pulpectomia (AAPD, 2014) que, adequadamente conduzida, permitirá ao dente decíduo desempenhar sua função até a esfoliação fisiológica e proporcionar condições como: manutenção de espaço no arco, benefícios estéticos, fonéticos e mastigatórios (CHAOLLÁI et al., 2009).

Características inerentes a estes dentes, como a variabilidade morfológica das raízes, incluindo condutos estreitos e curvos; complexa rede de canais acessórios, laterais e interradiculares; e ainda, reabsorção radicular fisiológica em bisel (GUPTA, 2005; AHMED, 2014), tornam complexo o tratamento endodôntico nos mesmos. Além disso, há dificuldades no manejo clínico do paciente pediátrico, relacionadas à realização de exames radiográficos, ao tempo longo dispendido na terapia pulpar e à imaturidade da criança ao relatar sintomas de dor/respostas condicionadas (RODD et al., 2006; TRAIRATVORAKUL; CHUNLASIKAIWAN, 2008).

Durante a Pulpectomia a eliminação dos microrganismos infectantes ocorre pelo preparo mecânico aliado ao uso de agentes irrigantes com ação antimicrobiana. A posterior obturação com pastas, além de complementar essa ação favorece o reparo tecidual (SILVA et al., 2010). Embora não haja um produto obturador que englobe todas as propriedades desejadas para a vedação da malha canalicular de dentes decíduos - que seja reabsorvível acompanhando a rizólise, radiopaco, de fácil inserção, antimicrobiano e que não cause injúrias ao germe do permanente e, principalmente biocompatível (RODD et al., 2006), as pastas a base de Hidróxido de Cálcio (PH) e as Iodoformadas (PI), estão entre os materiais de eleição para cumprimento dessa função (DUNSTON; COLL, 2008; BERGOLI et al., 2010).

A importância do aspecto de biocompatibilidade dessas pastas se dá pela comunicação existente entre a polpa e o ligamento periodontal através do forame apical (TOLEDO et al., 2010; HUANG et al., 2007), canais acessórios e laterais, uma vez que a pasta obturadora ocupará e permanecerá por um período de tempo ao longo do canal radicular, entrando assim em contato com a região periapical e tecidos adjacentes (HAUMAN; LOVE, 2003; HUANG et al., 2007).

Um material biocompatível não é necessariamente inerte, mas a reação tecidual ao material de teste deve conter um risco aceitável, em comparação com um material clinicamente aceito (PETERS, 2013).

O Hidróxido de Cálcio (HC) associado a outros materiais tem sido usado em inúmeras modalidades de tratamentos na endodontia, dentre elas o capeamento pulpar, como medicação intracanal e também como material obturador de canais radiculares (MOHAMMADI; DUMMER, 2011). Diversos são os veículos que podem ser utilizados no preparo das PH, dentre eles o Gluconato de Clorexidina (CHX) (GOMES et al., 2013), propilenoglicol, soro fisiológico e água destilada (SILVA et al., 2009). Apesar de apresentar limitações como a não radiopacidade e difícil manuseio durante sua inserção nos canais (FAVA; SAUNDERS, 1999), o HC é reabsorvível e parece não causar alterações para o sucessor permanente (MOHAMMADI; DUMMER, 2011). Embora sua biocompatibilidade seja demonstrada em estudos histológicos – implante ósseo e subcutâneo – (NELSON-FILHO et al., 1999; et al., 2002) e em ensaios de citotoxicidade com diferentes tipos celulares (HUANG et al., 2007; PIRES, 2014) para alguns autores ele apresentou citotoxicidade (HAUMAN; LOVE, 2003; DESAI; CHANDLER, 2009; SARIGOL et al., 2010; MOHAMMADI; DUMMER, 2011; KOBAYASHI et al., 2013; DIANAT et al., 2015). Também em relação ao aspecto de genotoxicidade é ainda discutido (RIBEIRO, 2008; PIRES, 2014).

Dentre as PH comercializadas encontramos a Calen® (S.S.White – Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ.Brazil) e a Ultracal® XS (Ultradente Products Inc, South Jordan, UT, USA). A Calen® é composta por 2,5g de hidróxido de cálcio; 0,5g óxido de zinco (ajuda a tornar lenta a reabsorção da pasta, acompanhando a rizólise); e 1,75mL de um veículo viscoso – o polietilenoglicol “400” – que mantém o HC por mais tempo no local de interesse, prolongando sua ação, diminuindo sua solubilidade e favorecendo sua difusão pela dentina (FAVA; SAUNDERS, 1999; LEONARDO et al., 2003). Para Leonardo et al. (2003), esta pasta apresenta ótima ação antimicrobiana e biocompatibilidade, demonstrada pela boa tolerância dos tecidos adjacentes, opinião corroborada por Nelson – Filho et al. (1999), Leonardo et al. (2006), Queiroz et al. (2011) e Andolfato et al. (2012) e por não apresentar citotoxicidade (PIRES, 2014).

A pasta Ultracal®XS é composta principalmente de metilcelulose 2% e HC a 35%. Sua atividade antimicrobiana apesar de limitada à algumas cepas (BLANSCET et al., 2008; ATHANASSIADIS et al., 2009), não mostrou diferença quando comparada com outras pastas a base de HC (SIRÉN et al., 2014), ação esta atribuída a sua alcalinidade elevada e capacidade em manter altos níveis de pH (SIRÉN et al., 2014). Quanto a sua

biocompatibilidade, em tecidos subcutâneos, demonstrou abundante infiltrado inflamatório, (SILVA et al., 2009), e aos testes de citotoxicidade, não causou morte celular, entretanto produziu ERO (espécies reativas de oxigênio) e dano oxidativo aos lipídios em 24h (PIRES, 2014). Além disso, as pastas Calen® e Utracal®XS demonstraram genotoxicidade (PIRES, 2014).

Dentre as PI, a pasta Guedes-Pinto (PGP) (GUEDES-PINTO et al., 1981), composta por Rifocort®, Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) e Iodofórmio é o material para obturação dos canais radiculares mais empregado nas Escolas de Odontologia Brasileiras (BERGOLI et al., 2010). A biocompatibilidade deste material foi atestada em estudos *in vivo*, em animais (MICHEL et al., 1985; FARACO – JÚNIOR; PERCINOTO, 1998; CERQUEIRA et al., 2008; LACATIVA et al., 2012), sob o aspecto da citotoxicidade, em fibroblastos (SANTOS, 1998), em CMSP (PIRES, 2014), e, sob aspecto da genotoxicidade (PIRES, 2014). Juntamente com esta pasta, PIRES (2014) avaliou as iodoformadas PMAX e PNEB, que também apresentaram um bom desempenho quanto à biocompatibilidade *in vitro*.

Para a avaliação da biocompatibilidade de materiais dentários, um conjunto de métodos padrões utilizados deve ser seguido de acordo com normas internacionais (ISO 10993-5, 2009) e com as características e uso de cada material. No tocante a materiais obturadores do canal radicular, tanto os testes primários de citotoxicidade em cultura celular, quanto os secundários (implantação subcutânea ou óssea em animais) e de aplicação (estudo clínico em seres humanos) são indicados, a fim de que se obtenham respostas biológicas desses materiais. Ensaios clínicos controlados continuam sendo a maior evidência científica, devido ao nível de resposta clínica que pode ser observado para identificar mecanismos específicos do desempenho do material (WATAHA, 2012).

A CMSP se caracterizam por serem de fácil obtenção, cultivo celular simples e são utilizadas para o diagnóstico citogenético (MALUF; RIEGEL, 2011). Estas células, por serem abundantes na circulação sanguínea, ficam expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes (MALUF; RIEGEL, 2011), por isso têm sido empregadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos. Presentes na região periapical dos dentes, participam nos processos inflamatórios e na liberação de mediadores de citotoxicidade, constituindo o tipo celular de interesse para este estudo. Neste contexto, ferramentas da Biologia Molecular, como a expressão gênica, podem ajudar na compreensão dos mecanismos celulares induzidos ou gerados por um material (PETERS, 2013).

Um método considerado recente, desde 1993, denominado reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) é uma técnica de quantificação do DNA, na qual pode-

se monitorar, em tempo real, a amplificação do gene de interesse. Devido à rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da técnica, a RT-PCR tornou-se um método importante para diagnósticos médicos, investigação forense ou biotecnológica. As suas aplicações estendem-se desde a genotipagem e a quantificação da expressão gênica, até à toxicologia forense e à biossegurança (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

O principal mecanismo utilizado na citotoxicidade mediada pelos linfócitos envolve a exocitose de grânulos citolíticos, que contêm como principais componentes a Granzimas A e B, Granulisina e Perforina .

A Perforina é uma proteína monomérica que, na presença de íons de cálcio, liga-se a membrana das células-alvo e sofre polimerização, formando canais transmembrana (poros) em toda superfície de contato das células-alvo com o linfócito T ativado (LIU et al., 2001), comprometendo a regulação hídrica das mesmas e, por consequência, ocasionando a destruição por lise osmótica (PERSECHINI et al., 1990). A Granulisina, assim como as Granzimas, dependem desses poros para entrar no interior da célula alvo. Liberada também por linfócitos ativados e células Natural Killer, a Granulisina tem seu mecanismo de atuação ligado a lipídeos presentes na estrutura de diversos patógenos, e tem a capacidade comprovada de causar morte (STENGER.,MODLIN, 1998; KUMAR et al., 2001). A Granulisina apresenta, além de suas atividades citotóxicas, função pró-inflamatória e quimiotática, atuando também na modulação da resposta inflamatória local (DENG et al., 2005). Dessa forma os materiais com potencial de toxicidade são capazes de gerar graves danos a nível celular, culminando em morte celular por apoptose ou necrose (ROSSIGNOL et al., 2004).

O mecanismo de apoptose ou também denominado de “morte programada” é um processo fisiológico celular que ocorre por diferentes situações em que a célula é exposta, como por exemplo, na resposta inflamatória, na organogênese e hematopoese e na eliminação de células após dano celular por agentes citotóxicos e genotóxicos (MONTAGNER, 2010). O processo de apoptose também pode ser desencadeado por fatores não fisiológicos, como os níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, baixa quantidade de nutrientes à célula, privação de fatores de crescimento, danos ao DNA e agentes quimioterápicos. Nesse processo, as Caspases desempenham um papel central, pois essas proteases orientam a “cascata” de apoptose uma vez ativadas por receptores denominados “receptores de morte” específicos na via de apoptose extrínica ou por liberação de citocromo (proteína intramembranar) por rompimento da membrana mitocondrial na via intrínica (ZAPATA et al., 2001).

As Caspases encontram-se no citoplasma na sua forma inativa e são categorizadas em iniciadoras (Caspase 1 e 8), cuja função é clivar pró-formas inativas de Caspases efetoras (Caspase 3), que ativadas irão clivar proteínas celulares levando a célula à apoptose (FISCHER et al., 2003).

Além das vias de apoptose principais, há via suplementar denominada via da Granzima B, que envolve citotoxicidade mediada por células linfócitos T e morte celular por ação de Perforina e Granzima B. Uma vez que esses grânulos citotóxicos são liberados por linfócitos T ativados, e a Perforina permite a entrada da Granzima B através de poros na membrana da célula-alvo, cliva proteínas efetoras como a pró-Caspase 3, ativando-a, permitindo a fragmentação do DNA, a degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, além da reticulação de proteínas e formação de corpos apoptóticos.

A via da Granzima A, outra via suplementar de apoptose, ativa um caminho paralelo de morte celular, independente de Caspases, causada por danos no DNA de cadeia simples (MARTINVALET et al., 2008).

Apesar de alguns estudos avaliarem a toxicidade de materiais obturadores usados em Odontopediatria (NELSON-FILHO et al., 1999; LEONARDO et al., 2003; LACATIVA et al., 2012; PIRES, 2014), não encontramos pesquisas que tenham analisado a citotoxicidade à nível de biologia molecular, de forma a quantificar a expressão de genes de mediadores citotóxicos: Perforina, Granzima (A e B) e Granulisina, manifestados por CMSP tratadas com pastas obturadoras endodônticas indicadas para dentes decíduos, de forma a avaliar a biocompatibilidade das mesmas, sendo este o objetivo deste estudo.

1. ARTIGO

Será submetido à revista: International Endodontic Journal. Edited By: PMH Dummer
Impact Factor: 2.273. ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 16/83 (Dentistry Oral
Surgery & Medicine). Online ISSN: 1365-2591.

**EXPRESSÃO DE GENES DE MEDIADORES CITOTÓXICOS DE CMSP
TRATADAS COM PASTAS ENDODÔNTICAS INDICADAS PARA
DENTES DECÍDUOS**

Brenda Lanza Nakashima¹, Adriana Lima de Mello Borba², Christopher Pereira Posser², Diulle Spatt Peres², Mirian Ferrão Maciel², Hemilaine Silveira de Almeida², Michele Rorato Sagrillo², Rodrigo de Almeida Vaucher², Juliana Rodrigues Praetzel¹

¹Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria; ²Curso de Biomedicina, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor correspondente:

Juliana Rodrigues Praetzel (e-mail: praetzel07@gmail.com)

Avenida Liberdade, 450/501 Santa Maria - RS, Brasil.

Código Postal: 97020-490

Telefone: +55(55) 91348066

1.1 Resumo

Objetivo: Pastas iodoformadas (PI) e a base de hidróxido de cálcio (PH) são empregadas na Pulpectomia de dentes decíduos, complementando a ação antimicrobiana do preparo químico mecânico e favorecendo o reparo tecidual. Essas pastas ocupam e permanecem por um período de tempo ao longo do canal radicular, entrando em contato com a região periapical e tecidos adjacentes, tornando-se o objetivo deste estudo quantificar a expressão relativa de genes de toxicidade manifestados pelas pastas, de forma a avaliar a biocompatibilidade das mesmas. **Metodologia:** Pelo ensaio RT-PCR, foram analisados mecanismos celulares induzidos ou gerados por extratos das pastas endodônticas: PI com Nebacetin (PNEB); com Maxitrol (PMAX); com Clorexidina (PCHX); e Guedes-Pinto (PGP); e PH: Calen® espessada com Oxido de Zinco (Calen®/ZOE); e pasta de Hidróxido de Cálcio com Clorexidina (PHCHX); Ultracal®XS, frente às células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), de forma a quantificar a expressão gênica relativa dos mediadores citotóxicos: Granzima A, Granzima B, Granulisina e Perforina. Previamente à expressão gênica, para analisar aspectos da viabilidade celular, foram realizados ensaios – MTT, LDH e atividade de Caspases. Após teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os resultados foram tratados por ANOVA de uma via e Tukey, com $p < 0,05$. **Resultados:** A PNEB foi a única pasta que expressou todos os mediadores citotóxicos avaliados ($p < 0,05$). Com relação à viabilidade celular, a PNEB apresentou aumento de Caspases 1 e 8 ($p < 0,05$); A PGP levou ao aumento das Caspases 1, 3 e 8 ($p < 0,05$); A PCHX diminuiu a viabilidade celular no MTT e LDH, além de apresentar aumento da atividade de todas as Caspases ($p < 0,05$). Nas PH, somente a Ultracal®XS apresentou valores de concentração significativos para Caspase 1, 3 e 8 ($p < 0,05$). **Conclusão:** Apesar da PNEB ter apresentado elevada expressão gênica relativa de todos os mediadores citotóxicos analisados, não causou diminuição da viabilidade celular, não ocasionando aumento da atividade da Caspase 3 (efetora da apoptose), demonstrando biocompatibilidade. Dentre as PI que apresentaram melhor biocompatibilidade sob o aspecto de citotoxicidade foram a PGP e PMAX. O material com potencial citotóxico verificado neste experimento foi a PCHX, pois diminuiu drasticamente a viabilidade celular, confirmada em dois ensaios e corroborada pela alta atividade de todas as Caspases analisadas, e ainda, devido à morte celular, a incapacidade de expressão gênica. Todas as PH desempenharam comportamento citocompatível, de acordo com os ensaios realizados e à luz da biologia molecular.

Palavras-chave: *Materiais Restauradores do Canal Radicular. Dente Decíduo. Reação em cadeia de pomilrase em Tempo Real. Expressão Gênica. Toxicidade.*

1.2 Introdução

Na terapia pulpar dos dentes decíduos, a desinfecção da malha canalicular ocorre pelo preparo mecânico aliado ao uso de agentes irrigantes antimicrobianos e posterior obturação com pastas que complementam essa ação e favorecem o reparo tecidual (Silva *et al.*, 2010). Uma vez que a pasta obturadora ocupará e permanecerá por um período de tempo ao longo do canal radicular, entrando em contato com a região periapical e tecidos adjacentes (Hauman;

Love, 2003; Huang *et al.*, 2007; Toledo *et al.*, 2010), é imprescindível que sejam biocompatíveis. As pastas base de Hidróxido de Cálcio (PH) e as Iodoformadas (PI) estão entre os materiais de escolha para cumprimento dessa função (Dunston; Coll, 2008; Bergoli *et al.*, 2010).

O Hidróxido de Cálcio (HC) associado a outros materiais tem sido usado em inúmeros modalidades na endodontia, dentre elas o capeamento pulpar, como medicação intracanal e também como material obturador de canais radiculares (Mohammadi; Dummer, 2011). Diversos são os veículos podem ser utilizados no preparo das PH, dentre eles o Gluconato de Clorexidina (CHX) (Gomes *et al.*, 2013). Embora sua biocompatibilidade seja demonstrada em estudos histológicos – implante ósseo e subcutâneo – (Nelson-Filho *et al.*, 1999; Santos, 1998; Souza *et al.*, 2000) e em ensaios de citotoxicidade com diferentes tipos celulares (Huang *et al.*, 2007; Pires, 2014), para alguns autores apresentou citotoxicidade (Hauman; Love, 2003; Desai; Chandler, 2009; Sarigol *et al.*, 2010; Mohammadi; Dummer, 2011; Kobaiashi *et al.*, 2013; Dianat *et al.*, 2015). Além disso, sua genotoxicidade tem sido discutida (Ribeiro, 2008; Pires, 2014).

Dentre as PH comercializadas encontramos a Calen® (S.S.White – Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ.Brazil) e a Ultracal®XS (Ultradente Products Inc, South Jordan, UT, USA). Para Leonardo *et al.* (2003 e 2006), a Calen® apresenta ótima biocompatibilidade, opinião corroborada por (Nelson-Filho *et al.*, 1999; Queiroz *et al.*, 2011; Andolfato *et al.*, 2012) e não é citotóxica frente às CMSP (Pires, 2014).

A pasta Ultracal®XS, composta principalmente de metilcelulose 2% e HC a 35%, teve sua biocompatibilidade atestada em subcutâneos de camundongos (Silva *et al.*, 2009) e, em testes primários de citotoxicidade, com CMSP, não causou morte celular, entretanto produziu ERO (espécies reativas de oxigênio) e dano oxidativo aos lipídios da membrana celular em 24h (Pires, 2014). Em estudo recente, as pastas Calen® e Ultracal®XS demonstraram genotoxicidade frente a CMSP (Pires, 2014).

Dentre as PI, a pasta Guedes-Pinto (PGP) (Guedes-Pinto *et al.*, 1981), composta por Rifocort®, Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) e Iodofórmio é o material para obturação dos canais radiculares mais empregado nas Escolas de Odontologia Brasileiras (Bergoli *et al.*, 2010). A biocompatibilidade desse material se deve ao seu comportamento em estudos *in vivo*, em animais (Michel *et al.*, 1985; Faraco – Júnior; Percinoto, 1998; Santos, 1998; Cerqueira *et al.*, 2008; Lacativa *et al.*, 2012). A sua citocompatibilidade e não genotoxicidade foi demonstrada por Pires (2014), *in vitro*, em CMSP, juntamente com as PI com Maxitrol® e Nebacetin® e Clorexidina em substituição ao Rifocort® da pasta original.

Para a avaliação da biocompatibilidade de materiais dentários, um conjunto de métodos padrões utilizados deve ser seguido de acordo com normas internacionais (ISO 10993-5, 2009) e com as características e uso de cada material. No tocante a materiais obturadores do canal radicular, os testes primários de citotoxicidade em cultura celular são os primeiros indicados, a fim de que se obtenham respostas biológicas dos mesmos. Neste contexto, ferramentas da Biologia Molecular, como a expressão gênica, podem ajudar na compreensão dos mecanismos celulares induzidos ou gerados por um material (Peters, 2013).

Apesar da hipótese de que materiais obturadores do canal radicular de dentes decíduos tenham um comportamento biocompatível, não encontramos pesquisas que tenham analisado a citotoxicidade à nível de biologia molecular, sendo o objetivo deste estudo quantificar a expressão de genes de toxicidade (Granzimas A e B, Granulisina e Perforina), expressos por CMSP tratadas com as PI e PH já citadas.

1.3 Materiais e Métodos

Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Nº 20457313.7.0000.5346), de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram compostos por quatro PI [pasta Guedes-Pinto (PGP), pasta Clorexidina (PCHX), pasta Maxitrol® (PMAX), pasta Sulfato de Neomicina Bacitracina (PNEB)], e três pastas PH (pasta Calen® espessada com óxido de zinco (Calen®/OZ), pasta de HCa com clorexidina (PHCHX) e UltraCal®XS (UltraCal) (Quadro 1).

A PGP foi proporcionada de acordo com Guedes-Pinto *et al.* (1981), com Iodofórmio (0,3 g), Paramonoclorofenol Canforado (0,1 mL) e pomada Rifocort® (0,25 g). Para as demais PI, o componente que alternava era a pomada, substituída por Gel de Gluconato de Clorexidina a 2%, ou pomada Maxitrol®, ou pomada de Sulfato de Neomicina+Bacitracina, na mesma quantidade (0,25 g), conforme Antoniazzi *et al.* (2014).

As PH foram representadas por três diferentes composições: a pasta Calen® (1 g) espessada com óxido de zinco (0,65 g) (Queiroz *et al.* 2011); a pasta de HCa (0,2 g) com Clorexidina (0,2 g) na proporção de 1:1 (Gomes *et al.*, 2013) e a pasta UltraCal®XS.

Quadro 1. Materiais que compõem as pastas obturadoras

Material	Aspecto físico	Composição
Iodofórmio (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil)	Pó	99 a 100,5% de iodofórmio
Paramonoclorofenol Canforado (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil)	líquido	paraclorofenol (30%), cânfora (70%), álcool etílico 96° e água deionizada
Gluconato de clorexidina a 2% (Nova Derme, farmácia de manipulação, Santa Maria RS, Brasil)	Gel	gluconato de clorexidina 2% em base de gel de natrosol
Maxitrol® (Alcon, São Paulo, SP, Brasil)	pomada	dexametasona micronizada bifásica, sulfato de neomicina, sulfato de polimixina B, hipromelose, excipientes (lanolina líquida anidra, com metilparabeno e propilparabeno como conservantes e vaselina sólida)
Sulfato de Neomicina + Bacitracina (EMS, Hortolândia, SP, Brasil) (Medicamento genérico do Nebacetin®)	pomada	sulfato de neomicina, bacitracina, excipientes (álcool cetílico, lanolina anidra, óleo mineral, polissorbato e vaselina sólida)
Rifocort® (Fórmula & Ação, farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil)	pomada	5mg/g acetato de prednisolona, 1,5mg/g rifamicina SV sódica, propilenoglicol e macrogol.
UltraCal® XS (Ultradent, Indaiatuba, SP, Brasil.)	pasta	35% de hidróxido de cálcio, 20% de sulfato de bário em solução aquosa de metilcelulose.
Calen® (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil)	pasta	2,5 g de hidróxido de cálcio, 0,5 g óxido de zinco, 0,05 g de colofônia e 1,75 mL de polietilenoglicol 400
Óxido de Zinco (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil)	Pó	99 a 100,5% de óxido de zinco
Hidróxido de Cálcio (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil)	Pó	hidróxido de cálcio P.A.
Propilenoglicol (Nova Derme, farmácia de manipulação, Santa Maria RS, Brasil)	líquido	propileno glicol

Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos, as pastas foram manipuladas em placas de vidro, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar. Na sequência, foram inseridas em placas de cultura celular de 24 poços, em um volume correspondente a 0,22 mL por poço. Cada poço contendo os produtos foi preenchido com 2,5 mL de meio de cultura celular RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino, suplementado com 1% de antimicrobianos penicilina/estreptomicina e 1% de antifúngico anfotericina B. Após, as placas permaneceram em estufa a 37 °C por 24 h (Bin *et al.*, 2012), a fim de obtermos os extratos das pastas.

O controle negativo foi constituído por CMSP em meio de cultura completo (soro fetal bovino, RPMI-1640, estreptomicina e penicilina) enquanto o controle positivo por CMSP e peróxido de hidrogênio à 100 un.

Cultura celular

Para os experimentos foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (CMSP), oriundas de amostras de sangue periférico de descarte já processadas, de indivíduos com idade média de 20 anos, não fumantes, não etilistas e não usuários de medicação crônica, recebidas após a realização de exames laboratoriais de pacientes no Laboratório Escola de Análises Clínicas do Centro Universitário Franciscano, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 31211214.4.0000.5306). As coletas de sangue foram realizadas por meio de punção venosa, utilizando tubos com heparina tipo Vacutainer[®], os quais foram empregados para separar CMSP e posteriores tratamentos e culturas com as células.

As amostras foram inicialmente centrifugadas para que houvesse a separação das CMSP das demais células sanguíneas (separação por gradiente de densidade - Histopaque[®] - 1077). As CMSP foram retiradas e colocadas em tubos contendo meio de cultura RPMI 1640, centrifugadas sob refrigeração à 1800 rpm, durante 10min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas com meio de cultura e contadas em câmara de *Neubauer*, através do corante Azul de Tripán 0,4%. As células foram cultivadas na densidade

de 2×10^5 cel/mL.

Tratamento das CMSP

Passado o período de 24 h de incubação dos extratos, as CMSP foram submetidas aos tratamentos e mantidas por 72h em estufa a 37°C e com 5% de CO₂, para posteriormente serem avaliadas (Bin et al., 2012). Foi verificado o Ph de cada pasta e este variou entre 7 e 7,4.

Testes de citotoxicidade

Foram realizados três testes de citotoxicidade, a fim de avaliar a viabilidade celular das amostras tratadas e do grupo controle.

O ensaio colorimétrico MTT, em que o reagente, de coloração amarelada, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio, é facilmente incorporado por células viáveis devido a sua característica hidrossolúvel. Este é metabolizado nas mitocôndrias pela ação da enzima succinato desidrogenase, formando cristais de formazan, insolúveis e de coloração azulada. Esses cristais ficam armazenados no citoplasma celular e são posteriormente solubilizados pela adição do dimetilsulfóxido (DMSO). A quantificação da redução do reagente MTT é avaliada através de espectrofotometria. O valor da absorbância é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Denizot; Lang 1986).

Em placa de ELISA de 96 poços com as CMSP tratadas, o reagente MTT (diluído em PBS) foi adicionado em cada poço. Após a incubação da placa por 4h (Fukui *et al.* 2010), foi realizada a remoção do sobrenadante dos poços, e adicionado 200 µL de DMSO, para que os cristais de formazan fossem liberados para o meio extracelular. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O teste foi realizado em triplicata e os valores obtidos para cada grupo foram calculados em relação à porcentagem do grupo controle, considerada como 100%.

Também para análise de citotoxicidade foram avaliada a atividade das Caspases, que são enzimas que participam das três vias de apoptose (a Intrínscica, a Extrínscica e a das Granzimas), nesse complexo e sofisticado mecanismo, elas possuem atividade proteolítica, clivando proteínas e ácidos residuais, e exercem funções específicas, podendo ser

classificadas em iniciadoras (Caspase 2, 8, 9, 10); efetoras ou executoras (3, 6, 7) e inflamatórias (1, 4, 5) (Rai *et al.*, 2005). Para o ensaio da atividade das Caspases, as CMSP foram incubadas sob as mesmas condições descritas no teste anterior. As 48 análises foram determinadas por ensaio imunoenzimático de Caspases humanas, pelo kit (*Quantikine Human Caspases*) mensurando Caspase 1, 3 e 8 em sobrenadante de cultura celular usando placa de 96 poços (Sagrillo *et al.*, 2015), de acordo com o fabricante. O experimento foi realizado em sextuplicata e a densidade óptica foi determinada dentro de 30 min, usando um leitor de microplacas fixado para 450 nm.

O teste LDH, ocorre por meio de um marcador de membrana íntegra, que, quando danificada libera a enzima lactato desidrogenase, presente em todo o citoplasma celular, para o meio externo. Uma vez no sobrenadante, sua presença é detectada devido a reação de redução que ocorre, por meio de sua ação catalítica e indireta de conversão do 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2h-tetrazolium cloro (INT) em formazan, um corante solúvel em água. Para mensurar a LDH da cultura de CMSP, os sobrenadantes provenientes das placas com as amostras tratadas e o controle, foram coletados no período de 72 h. Após a coleta, os sobrenadantes foram divididos em alíquotas, as quais foram utilizadas para dosagem de LDH utilizando Labtest Kit (Labtest Diagnóstica SA) através do CELM analisador automático SBA 200® (CELM, Barueri / SP, Brasil).

Extração de RNA

Com as amostras tratadas foi feito um *pool* de células, que passaram por centrifugação refrigerada (5 min/2000 rpm). O sobrenadante foi retirado, as células lavadas com 5 mL de PBS (pH 7,4) e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi novamente descartado e às células tratadas foi adicionado 1 mL de Trizol (Quick-Zol Trizol), reagente de fácil uso para isolamento simultâneo de DNA, RNA e proteínas de amostras de tecido ou células, capaz de lisar e/ou homogeneizar amostras de tecido, dissolvendo todo o seu conteúdo. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 min - para assegurar uma completa dissociação - e, na sequência, adicionado 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação (vórtex) por 15 s. Após 10 min em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 15 min / 12.000 rpm à 4 °C. Três fases distintas foram formadas: fase aquosa – menos densa – com RNA; fase intermediária - com DNA; e a fase orgânica, mais densa, contendo proteína. Foi retirada a fase aquosa para outro tubo limpo e adicionado 500 µL de isopropanol (misturados por inversão) e, após repouso por 10 min, as amostras foram centrifugadas 12.000 rpm

durante 10 min à 4 °C, e o sobrenadante novamente descartado. O RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (misturados por inversão), e centrifugado a 5 min/7.500 rpm, descartando o sobrenadante. O RNA foi então dissolvido em 25 µL de água livre de RNase. As amostras foram levadas ao espectrofotômetro a 260 nm para quantificar o RNA. Foi considerado 1 unidade de OD= 40 µmL e congeladas em -80 °C.

Protocolo de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Tempo Real)

A RT-PCR envolve três fases: a desnaturação ou separação da dupla fita de DNA por aquecimento a uma temperatura elevada (94 °C e 96 °C); a hibridização dos primers, nos quais os pares de genes se recombinaem com as duas cadeias de DNA separadas com elevada especificidade; e a fase de extensão do DNA, na qual a temperatura é elevada até o intervalo de 72 °C – 76 °C que coincide com a temperatura a que a DNA polimerase tem seu máximo de atividade, sintetizando a cadeia complementar utilizando os dNTP's (Ma *et al.*, 2006). No fim de um ciclo de RT-PCR são obtidas duas novas cadeias de DNA para cada alvo da dupla cadeia. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da técnica de PCR, fazendo com que se dê um crescimento exponencial, havendo, ao fim de n ciclos, 2n vezes mais cópias do que havia no início (Delidow *et al.*, 1993).

A RT-PCR foi realizada em equipamento de análise em tempo real Esco (SwiftTM Spectrum Thermal Cycler 48) utilizando metodologia com corante intercalante SYBR®Green. Em eppendorf óptico (MicroAmpTM Optical 8 – Tube Strip) de 0,2 mL, foram adicionados 0,25 µL de RNA (0,26 µL para a pasta PNEB e 0,27 µL para a pasta PCHX); 6,8 µL do “master mix” 8 µL do *primer sense* e 8 µL do *primer anti-sense* previamente diluídos na concentração de 80 pM/reação contendo Transcriptase reversa, Taq polimerase, dNTPs, Rox, MgSO₄ e SYBR®Green (SuperScriptTM III Platinum® - SYBR®Green one-step qRT-PCR Kit with ROX, InvitrogenTM) e 2,95 µL de água livre de RNase, com volume final da reação de 10 µL. As amostras foram colocadas no aparelho de RT-PCR e submetidas a um ciclo de 50 °C por 3 min, um ciclo de 95 °C por 5 min e 45 ciclos de amplificação: 45 °C a 95 °C por 15 s, seguido de um período de anelamento/extensão a 60 °C por 30 s. Para avaliar a especificidade dos *primers* utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de “melting” (aquecimento gradual da amostra amplificadas de 90 °C a 60 °C com incremento de 0,3 °C) na qual é possível observar a dissociação dos produtos de amplificação (Longui, 2010).

Quadro 2. Sequências dos “primers” utilizados na RT-PCR para os mediadores citotóxicos avaliados

GENE	SEQUÊNCIA (5' -> 3')	EFICIÊNCIA
GAPDH	ACC AGA GTT AAA AGC AGC CC AGT CAG CCG CAT CTT CTT TT	
GRANZIMA A	AAG AGT TTC CCT ATC CAT GCT ATG A TTT GCT TTT TCC GTC AGC TGT A	92,6%
GRANZIMA B	TGC AAC CAA TCC TGC TTC TG CGA TGA TCT CCC CTG CAT CT	90,0%
GRANULISINA	CTG AGC CCT CTC ACC TTG TC GGA GAG TGG ATT CTG GAT CG	94,6%
PERFORINA	GGA GAG TGG ATT CTG GAT CG AAC AGC CTC TTG GCC TTC TG	94,7%

Análise estatística

Os dados foram tabulados e expressos em média (\pm desvio padrão) usando dois programas estatísticos: Assistat (versão 7.7, Prof. Dr. Francisco de A.S. e Silva - Universidade de Campina Grande, Brasil) e Graph Pad Prims (versão 5.04). Após o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os dados foram avaliados através de ANOVA de 1 via seguido do teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

1.4 Resultados

No ensaio MTT encontramos morte celular estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente no grupo PCHX (Figura 1). Níveis altos de LDH, com significância estatística ($p < 0,05$), indicam diminuição da viabilidade celular somente para PCHX (Figura 2).

Quanto à atividade das Caspases, das PI, a PGP e PCHX apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de todas as Caspases (Caspases 1, 3 e 8), enquanto para PNEB somente as Caspases 1 e 8 demonstraram altos níveis estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Das PH, somente a Ultracal apresentou valores de concentração significativos ($p < 0,05$) para Caspase 1, 3 e 8. (Figura 3).

Os resultados da Expressão Gênica relativa dos mediadores citotóxicos Granzima A e Granzima B, Granulisina e Perforina, em RNAm de CMSP, tratadas com pastas obturadoras endodônticas, pelo método RT-PCR, estão demonstrados na Figura 4. Neste ensaio, somente a PNEB apresentou aumento estatisticamente significativo de todos os mediadores citotóxicos avaliados.

1.5 Discussão

O material obturador de canal radicular deve ser selecionado a partir de parâmetros físicos e biológicos que envolvem os vários aspectos da biocompatibilidade, como a toxicidade local e sistêmica (Geurtsen, 2001), sendo a citotoxicidade um dos aspectos da biocompatibilidade (Hauman; Love, 2003; Peters, 2013). Não é apropriado caracterizar um material como biocompatível apenas por uma metodologia (Hauman; Love, 2003; Peters, 2013). Vários testes/métodos de estudos *in vitro* (com cultura celular) e *in vivo* (histológicos), tem sido descritos na literatura com o objetivo de elucidar os mecanismos biológicos por trás de uma reação clínica observada, dentre esses, uma variedade de abordagens da biologia molecular (Peters, 2013).

A fim de compreender melhor o complexo comportamento de tolerância tóxica de CMSP frente a algumas pastas obturadoras usadas em Odontopediatria (PGP, Calen®/ZnO e Ultracal®XS) e outras ainda discutidas na literatura (PNEB, PMAX, PCHX e PHCHX), empregamos a biologia molecular, com o objetivo de quantificar a expressão gênica de mediadores citotóxicos liberados por essa linhagem celular, especialmente por linfócitos T (Trowbridge, 1990; Elmore, 2007) tratados com as referidas pastas.

As CMSP são comumente utilizadas na avaliação da citotoxicidade (Ciapetti *et al.*, 1983; Mohammadi; Dummer, 2011), pois fornecem uma estimativa da média de exposição do organismo aos produtos com potencial genotóxico (Maluf; Riegel, 2011). As pastas obturadoras do canal radicular, aplicadas dentro da malha canalicular, podem circular na corrente sanguínea, depois de penetrar na dentina e no periodonto, ou passando por forames e ramificações apicais (Bartelstone, 1951; Tucker, 1981), assim, essas células poderão registrar um possível dano que os produtos que ali passam podem provocar no organismo.

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) é hoje fundamental na investigação médica, forense ou biotecnológica, devido a sua rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Suas aplicações compreendem a genotipagem, toxicologia forense e, sobretudo, quantificação da expressão gênica e biossegurança (MA *et al.*, 2006; PELT-VERKUIL *et al.*, 2008).

Anterior a quantificação gênica dos mediadores citotóxicos foram realizados testes para observar a viabilidade celular das CMSP tratadas com as pastas e do grupo controle, pelos testes MTT, LDH e as Caspases 1, 3 e 8.

O MTT é um teste eficiente para analisar a citotoxicidade sutil de alguns materiais, que não causam morte celular rapidamente (dentro do período do teste/72 h), mas com potencial para afetar o metabolismo e as funções da célula (Ciapetti *et al.*, 1983). Este ensaio já foi empregado em estudos prévios com pastas obturadoras para dentes decíduos (Huang *et al.*, 2007; Sarigol *et al.*, 2010; Pires, 2014).

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima liberada para o meio extracelular no momento em que a célula se rompe ao sofrer dano, e por meio de uma reação bioquímica é dosada em ensaio cinético. O LDH permite analisar o número total de células viáveis, correlacionado com a proliferação das mesmas (Qiao-Jing *et al.*, 2015).

A apoptose é um processo fundamental e essencial para manter a homeostase e desenvolvimento do tecido normal e está internamente associada com a ativação das Caspases, que geram morte celular por meio de proteólise de variados substratos celulares (Fischer *et al.*, 2003; Montagner *et al.*, 2010). As Caspases iniciadoras (Caspases 1, 8) clivam pró-formas inativas de Caspases efetoras (Caspase 3) ativando-as e dando início a “cascata” de apoptose (Zapata *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003).

As PI - PGP, PNEB e PMAX -, apresentaram viabilidade celular semelhante ao controle no MTT e LDH, demonstrando um bom comportamento biológico nestes dois ensaios. Para a atividade de Caspases, a PGP apresentou um aumento significativo na produção das Caspases 1, 3 e 8 que pode estar relacionado ao processo fisiológico de

renovação celular/homeostase, uma vez que a morte celular por apoptose faz parte do mesmo (Fischer *et al.*, 2003). A PMAX além de não ter alterado a viabilidade celular também não expressou mediadores citotóxicos, assim como a PGP. Todavia, para PNEB, houve aumento significativo das Caspases iniciadoras da apoptose - 1 e 8, e os níveis de expressão de todos os mediadores avaliados foram altos e estatisticamente significantes em relação ao controle. Sugere-se que este comportamento tenha relação com um dos componentes da pasta em questão, sulfato de neomicina + bacitracina zíncica, um aminoglicosídeo cujo potencial tóxico (ototoxicidade e nefrotoxicidade) é conclusivo na literatura (Oliveira *et al.*, 2006; Zimmerman; Lahav, 2013). Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S do ribossomo, diminuindo a síntese proteica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, causando alteração na produção de proteínas, ou seja, o gene dos mediadores são expressos, porém o produto final dessas proteínas fica comprometido, fazendo com que uma das vias de apoptose – via da Granzima B – não se complete, não havendo produção aumentada de Caspases 3 (Caspase efetora), portanto não havendo morte celular (Oliveira *et al.*, 2006). As concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas estão próximas das doses tóxicas (baixo índice terapêutico), porém a dose utilizada no experimento foi de apenas 10U (em 0,25 g).

Esses resultados inferem um comportamento biocompatível dessas pastas, corroborando com vários autores (Cerqueira *et al.*, 2008; Sarigol *et al.*, 2010; Lacativa *et al.*, 2012; Pires, 2014) sobre a PGP e com os resultados encontrados por Pires (2014) para as três pastas em ensaios de cito e genotoxicidade com o mesmo tipo celular deste experimento.

A PCHX causou morte celular no MTT e aumento significativo de todas as Caspases e LDH, conseqüentemente, na RT-PCR demonstrou baixa expressão de todos os mediadores citotóxicos avaliados, afinal, o gene só se torna ativo em um quadro de normalidade celular e não com um funcionamento fisiológico alterado, como desequilíbrio bioquímico com clivagens de proteínas e quebras de DNA (Hengartner, 2000). A citotoxicidade encontrada para esta pasta pode estar associada à Clorexidina. Diferentes estudos que utilizaram células do ligamento periodontal (Chang *et al.*, 2001), osso alveolar humano (Cabral; Fernandes, 2007), osteoblastos (Lee *et al.*, 2010), demonstraram citotoxicidade dessa substância, empregando ensaios primários de toxicidade. Também, quando usada em concentrações consideradas bactericidas, como a deste estudo, a CHX foi letal em fibroblastos caninos, enquanto em concentrações não letais, permitiu a sobrevivência significativa de bactérias (Sanchez *et al.*, 1988). Além disso, foi observado que concentrações baixas desse fármaco estão associadas à indução de apoptose, enquanto as mais elevadas à necrose por disfunções

mitocondriais e estresse oxidativo (Li *et al.*, 2012). Esses eventos estão relacionados com sua dose e tempo de administração, especialmente em osteoblastos (Li *et al.*, 2012).

A biocompatibilidade da CHX tem causado ambivalência de opiniões, o que pode estar associado a variedade de metodologias empregadas para estes estudos – tipos de células - concentrações e a forma de uso associada ou isolada (Dammachke *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Pires, 2014).

Outros fármacos com comportamento citotóxico que compõem a PCHX são o PMCC e o Iodofórmio. O PMCC demonstrou essa propriedade em fibroblastos do ligamento periodontal humano pelo ensaio MTT (Wang *et al.*, 2007) assim como aumento na produção de EROS (Pires, 2014). Da mesma forma, o iodofórmio acusou este comportamento quando testado em linhagem de células L929 (Sarigol *et al.*, 2010) pelo MTT; em macrófagos e células epiteliais pelo ensaio colorimétrico XTT (Petel *et al.*, 2013); em células da polpa dental humana (D824), pela análise da habilidade em formar colônias celulares, onde elevou a taxa de morte por apoptose (Kobaiashi *et al.*, 2013); e em CMSP aumentou as taxas de EROS (Pires, 2014). Em contrapartida, quando o Iodofórmio foi associado ao HC, apresentou alta taxa de viabilidade celular (Huang *et al.*, 2007). Embora o HC nanoencapsulado ou convencional demonstre citotoxicidade por MTT em células do ligamento Periodontal (Dianat *et al.*, 2015) e células da polpa dental humana (D824) (Kobaiashi *et al.*, 2013), ou ainda suave citotoxicidade (Desai; Chandler, 2009), em CMSP, não demonstrou citotoxicidade quanto a viabilidade celular e estresse oxidativo (Pires, 2014).

A pasta Calen®/ZnO não diminuiu a viabilidade celular pelo ensaio MTT (e sim provocou proliferação significativa em relação ao controle), apresentou atividade de Caspases semelhante ao controle e não alterou significativamente os níveis de LDH, demonstrando um comportamento biocompatível frente as CMSP, corroborado pela não expressão dos mediadores citotóxicos avaliados. Pires (2014), quando avaliou esta pasta pelo ensaio MTT, em CMSP, encontrou resultado semelhante. Nelson-Filho *et al.* (1999), avaliaram a Calen® sem óxido de zinco, no subcutâneo de camundongos e constataram um aumento crescente e significativo de células mononucleadas (das primeiras 12 h até o quinto dia do experimento), sugerindo este fenômeno como uma resposta dessas células ao processo inflamatório local à pasta. Esses resultados vem ao encontro de estudos histológicos (Silva *et al.*, 2010 - tecido apical e periapical de cães; Queiroz *et al.*, 2011; Andolfato *et al.*, 2012- ambos subcutâneo de camundongos), que atestaram sua biocompatibilidade e indicaram seu espessamento com ZnO (Queiroz *et al.*, 2011). Mesmo quando a Calen® foi associada a CHX 0,4%, em estudo histológico em camundongos, demonstrou biocompatibilidade (Silva *et al.*, 2009).

Neste estudo, a PHCHX demonstrou não causar alterações no metabolismo celular, na integridade da membrana ou na expressão de mediadores de citotoxicidade, sugerindo que a associação do HC com a CHX é bem sucedida levando a um comportamento biocompatível desse material frente às CMSP. Semenoff *et al.* (2008), quando avaliaram histologicamente (por meio de tubos de polietileno implantados na submucosa bucal de camundongos) o HC e a CHX associados e isolados, não encontraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle (água destilada) quanto aos eventos inflamatórios e gravidade da inflamação. Ainda, em análise histológica, após indução de periodontite apical em camundongos e posterior tratamento com gel de CHX 2% (a mesma deste estudo) e pasta de HC, como medicação intracanal por 7 dias, a CHX demonstrou boa regeneração tecidual, sendo sugerida como uma alternativa ao HC (Dammaschker *et al.*, 2005). Em ensaios primários de citotoxicidade, dentre eles MTT e LDH, usando fibroblastos humanos, foi constatada a citotoxicidade do Dycal® (material para capeamento pulpar à base de HC) isoladamente e associado a outros agentes, entre eles a CHX 0,001%, que não parecem interferir sinergicamente para aumentar os efeitos celulares nocivos causados Dycal® *in vitro* (Wheater *et al.*, 2012). Entretanto, Barbin *et al.* (2013) avaliaram, por método cromatográfico, a mistura de HC com solução aquosa de CHX 2%, e esta última isolada, e observaram liberação de sub-produtos tóxicos (para-cloroanilina) e EROS nos dois tempos de análise (imediate e 7 dias). Os resultados sugerem um potencial tóxico da solução aquosa de CHX 2%, uma vez que estes sub-produtos podem causar danos oxidativos em estruturas celulares, como lipídios e proteínas (Barbin *et al.*, 2013).

Para a pasta Ultracal®XS, outra representante comercial das pastas à base de HC, o comportamento de biocompatibilidade pelos testes aqui representados parece ser o mesmo da Calen®/ZnO e PHCHX. Os níveis das Caspases 1, 3 e 8 expressos pela Ultracal®XS podem ser justificados pelo processo de apoptose, fundamental e essencial para manter a homeostase e o desenvolvimento fisiológico do tecido (Fischer *et al.*, 2003). A viabilidade celular por MTT e LDH demonstrou ser semelhante ao controle, assim como a expressão gênica que acompanhou esse comportamento. Estudos histológicos atestaram a biocompatibilidade desta pasta juntamente com outras a base de HC, como Hydropast® e a Calen® (Mohammadi; Abbott, 2009; Andolfato *et al.*, 2012; Pires, 2014). No entanto, a associação da Ultracal®XS com CHX 2% em subcutâneo de camundongos apresentou abundante infiltrado inflamatório e exsudato, resultados insatisfatórios que sugerem agressão residual persistente da associação desses materiais (Silva *et al.*, 2009).

1.6 Conclusão

Apesar da PNEB ter apresentado elevada expressão gênica relativa de todos os mediadores citotóxicos avaliados, não causou diminuição da viabilidade celular, não levando ao aumento da atividade de Caspase 3 (efetora da apoptose), demonstrando biocompatibilidade. Dentre as PI que apresentaram melhor biocompatibilidade sob o aspecto de citotoxicidade foram a PGP e PMAX. O material com potencial citotóxico verificado neste experimento foi a PCHX, pois diminuiu drasticamente a viabilidade celular, confirmada em dois ensaios, corroborada pela alta atividade de todas as Caspases analisadas, e ainda, devido a morte celular, a incapacidade de expressão gênica.

Todas as PH desempenharam comportamento citocompatível, de acordo com os ensaios realizados e à luz da biologia molecular.

1.7 Referências

Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL *et al.* (2012) Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *International Scholarly Research Network Dentistry* **2012**, 1-6.

Antoniuzzi BF, Pires CW, Bresolin CR, Weiss RN, Praetzel JR (2015) Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. *Brazilian Oral Research* **29**, 1-6.

Aydos JH, Milano NF (1984) Revisão bibliográfica sobre o uso do iodofórmio em endodontia. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre* **26**, 43-51.

Barbin LE, Estrela C, Guedes DF, Spanó JC, Sousa-Neto MD, Pécora JD (2013) Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4-nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* **39**, 664-8.

Barcelos R, Santos MP, Primo LG, Luiz RR, Maia LC (2011) ZOE paste pulpectomies outcome in primary teeth: a systematic review. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* **35**, 241-8.

Bartelstone HJ (1951) Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *Journal of Dental Research* **30**, 728-733.

Bergoli AD, Primosch RE, De Araujo FB, Ardenghi TM, Casagrande L (2010) Pulp therapy in primary teeth--profile of teaching in Brazilian dental schools. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* **35**, 191-5.

Bin CV, Valera MC, Camargo SEA *et al.* (2012) Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* **38**, 495-500.

Cabral CT, Fernandes MH (2007) In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig* **11**, 155-164.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY (2001) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **92**, 446-450.

Cerqueira DF, Mello-Moura ACV, Santos EM, Guedes-Pinto AC (2008) Cytotoxicity, histopathological, microbiological and clinical aspects of an endodontic iodoform-based paste used in pediatric dentistry: a review. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* **32**, 105–110.

Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A (1983) *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* **14**, 359-354.

Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo JM, Schäfer E (2005) Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand* **63**, 143-52.

Deng, A.; Chen, S.; Li, Q.; Lyu, S.C. ; Clayberger, C.; Krensky, A.M (2005) Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* **174**, 5243-8.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* **89**, 271-277.

Desai S, Chandler N (2009) Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod* **35**, 475-80.

Dianat O, Azadnia S, Mozayeni MA (2015) Toxicity of Calcium Hydroxide Nanoparticles on Murine Fibroblast Cell Line. *Iranian Endodontic Journal* **10**, 49-54.

Dunston B, Coll JA (2008) A survey of primary tooth pulp therapy as taught in US dental schools and practiced by diplomates of the American Board of Pediatric Dentistry. *Pediatric Dentistry* **30**, 42-8.

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495–516.

Estrela C, Holland R (2003) Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* **11**, 269-82.

Faraco-Junior IM, Percinoto C (1998) Avaliação de duas técnicas de pulpectomias em dentes decíduos. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* **52**, 400-404.

- Fava LR, Saunders WP (1999) Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International Endodontic Journal* **32**, 257-82.
- Fischer U et al. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation* **10**, 76-100.
- Fukui M, Yamabe N, Zhu BT (2010) Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Cancer* **46**, 1882-91.
- Geurtsen W (2001) Biocompatibility of root canal filling materials. *Australian Endodontic Journal* **27**, 12-21.
- Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR (1981) Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* **35**, 240-45.
- Gomes BPF, Vianna ME, Zaia AA, José Flávio A. Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR (2013) Chlorhexidine in Endodontics. *Braz Dent J* **24**, 89-102.
- Hauman CHJ, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* **36**, 75-85.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.
- Huang TH, Ding SJ, Kao CT (2007) Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **80**, 486-490.
- International Standard ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.
- Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno, M, Higo Y, Inaba T, Tsutsui T (2013) Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology* **101**, 43-51.
- Lacativa AM, Loyola AM, Sousa CJ (2012) Histological evaluation of bone response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. *Brazilian Dental Journal* **23**, 635-44.
- Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC (2010) Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J* **43**, 430-35.
- Leonardo MR, Salgado AA, Da Silva LA, Tanomaru Filho M (2003) Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* **17**, 69-74.
- Li YC, Kuan YH, Lee SS, Huang FM, Chang YC (2012) Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages *in vitro*. *Environ Toxicol* **29**, 452-8.

Liu CH *et al.* (2001) Over expression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* **276**, 18563-69.

Longui LNA (2010) Avaliação da participação das células NK (células cd56+) na resposta ao Paracoccidioides Brasiliensis (dissertação). Campinas, Brasil: Universidade Estadual de Campinas.

Ma H, Shieh KJ, Chen G, Qiao T, Chuang MY (2006) Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science* **2**, 1-15.

Maluf SW, Riegel M (2011) Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: *Citogenética Humana*, 1st ed Porto Alegre, Brasil : Artmed.

Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J (2008) Granzyme A Cleaves a Mitochondrial Complex I Protein to Initiate Caspase-Independent Cell Death. *Cell*. **16**, 681-92.

Michel JA, Guedes-Pinto AC, ARAÚJO VC (1985) Estudo histopatológico de reação do subcutâneo de camundongos submetidos à ação de pasta obturadora utilizada na terapia endodôntica de dentes decíduos. *Revista de Odontologia da Faculdade de São Paulo* **23**, 65-72.

Mohammadi Z, Abbott PV (2009) The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* **42**, 288-302.

Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* **44**, 697-730.

Montagner GFS, SAGRILLO M, Machado MM *et al.* (2010) Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology In Vitro* **24**, 1410-16.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63.

Nelson Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F (1999) Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J* **32**, 303-11.

Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdman EA (2006) Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Braz J Cardiovasc Surg* **21**, 444-52.

Persechini PM, YOUNG JDE, ALMERS W (1990) Membrane channel formation by the lymphocyte pore-forming protein: comparison between susceptible and resistant target cells. *J.Cell.Biol* **110**, 2109-16.

Petel R, Moskovitz M, Tickotsky N, Halabi A, Goldstein J, Houry-Haddad Y (2013) Cytotoxicity and proliferative effects of Iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Arch Oral Biol* **58**, 75-81.

Peters OA (2013) Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *International Endodontic Journal* **46**, 195-7.

Pires CW (2014) Induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth (Dissertação). Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria.

Queiroz AM, Assed S, Consolaro A *et al.* (2011) Subcutaneous Connective Tissue Response to Primary Root Canal Filling Materials. *Brazilian Dental Journal* **22**, 203-11.

Qiao-Jing L, Yong-Sheng L, Xiu-Feng G (2015) A Novel Analysis Method Dehydrogenase Activity in Serum Samples Based on Fluorescence Capillary Analysis. *Analytical Science* **31**, 413-19.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* **4**, 138-44.

Ribeiro DA, Scolastici C, de Almeida PLA, Marques PLA, Marques MEA, Salvadori MF (2005) Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **99**, 637-40.

Ribeiro DA (2008) Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **105**, 251-6.

Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata k, Remington SJ, Capaldi RA (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 985 – 993.

Sagrillo MR, Garcia LF, de Souza Filho OC *et al.* (2015) Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chem* **173**, 741-8.

Sanchez IR, Nusbaum KE, Swaim SF, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA (1988) Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *Vet Surg* **17**, 182-85.

Santos EM (1998) Análise da citotoxicidade *in vitro* de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos (Dissertação). São Paulo, Brasil : Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

Sarigol CG, Cogulu D, Oncag O, Deliloglu IG (2010) Cytotoxic effects of primary tooth root canal filling materials on L929 cell line. *Journal of Dentistry for Children (Chicago, Ill)* **77**, 72-6.

Semenoff TA, Semenoff Segundo A, de Figueiredo JA (2008) Biocompatibility of different intracanal medications in rat buccal submucosa tissue. *J Appl Oral Sci* **16**, 12-7.

Silva LAB, Leonardo MR, Oliveira DSB *et al.* (2010) Histopathological Evaluation of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth. *Brazilian Dental Journal* **21**, 38-45.

Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LAB, Consolaro A (2009) Subcutaneous Tissue Response of Isogenic Mice to Calcium Hydroxide-Based Pastes with Chlorhexidine. *Braz Dent J* **20**, 99-106.

McWilliam SJ, Antoine DJ, Sabbisetti V, Turner MA, Farragher T, Bonventre FJ, Park BK, Smyth RL, Pirmohamed M (2012) Mechanism-Based Urinary Biomarkers to Identify the Potential for Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity in Premature Neonates: A Proof-of-Concept Study. *PLOS ONE* | www.plosone.org v.7 ed. 8.

Toledo R, Britto MLB, Pallotta RC, Nabeshima CK (2010) Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio no tratamento endodôntico de dentes com Rizogênese Incompleta. *Int J Dent* **9**, 28-37.

Trairatvorakul C, Chunlasikaiwan S (2008) Success of Pulpectomy With Zinc Oxide-Eugenol Vs Calcium Hydroxide/Iodoform Paste in Primary Molars: A Clinical Study. *Pediatric dentistry* **30**, 303-308.

Trowbridge HO (1990) Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J Endod* **16**, 54-61.

Tucker MJ (1981) The systemic toxicity evaluation of dental materials. *International Endodontic Journal* **14**, 49-52.

Wang XL, Song M, Lou JN, Niu XY (2007) The study of cytotoxicity of different intracanal medications and cell rehabilitation on human periodontal ligament fibroblasts. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. **16**, 512-9.

Wataha JC (2012) Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater* **28**, 23-40.

Wheater MA, Falvo J, Ruiz F, Byars M (2012) Chlorhexidine, ethanol, lipopolysaccharide and nicotine do not enhance the cytotoxicity of a calcium hydroxide pulp capping material. *Int Endod J* **45**, 989-95.

Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC (2001) A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 24242-24252.

Zimmerman E, Lahav A (2013) Ototoxicity in preterm infants: effects of genetics, aminoglycosides, and loud environmental noise. *J Perinatol* **33**, 3-8.

1.8 Figuras

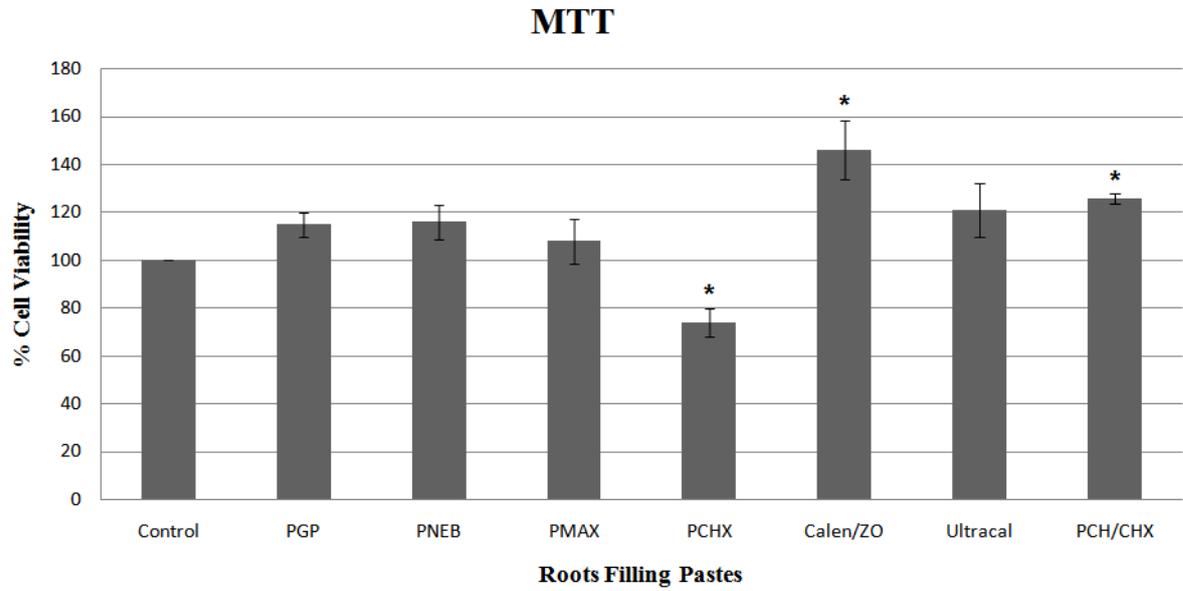


Figura 1. Resultados do Ensaio MTT. Dados expressos em média (\pm desvio padrão).
* $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

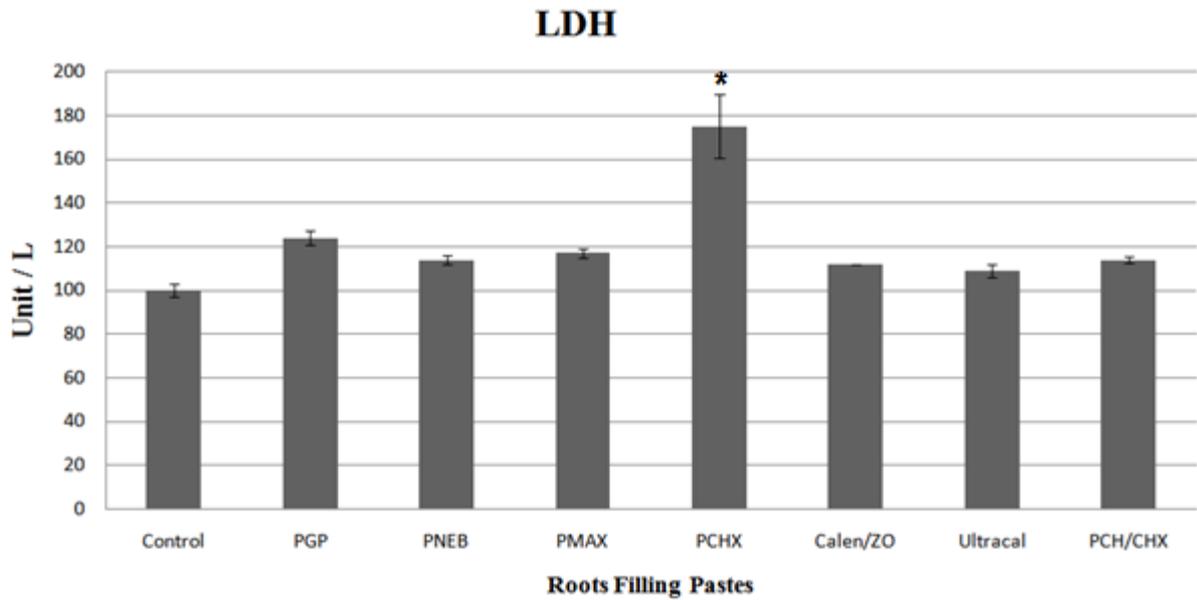


Figura 2. Resultados do Ensaio LDH. Dados expressos em média (\pm desvio padrão). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

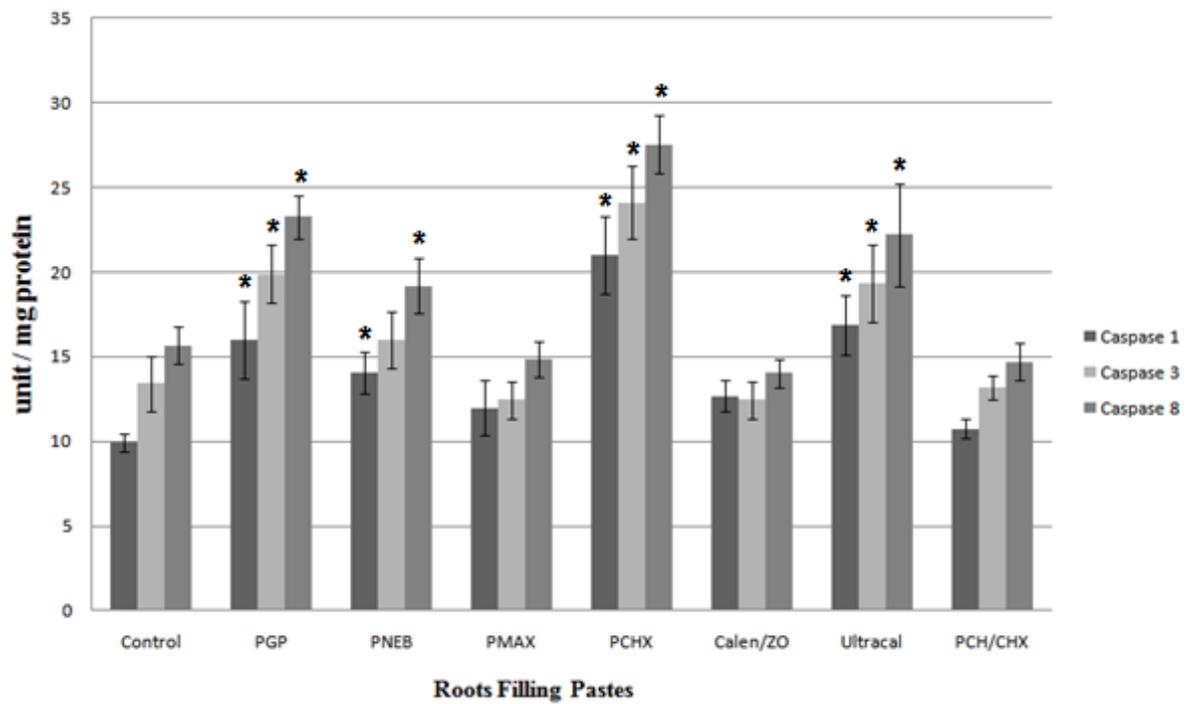


Figura 3. Resultados do Ensaio de Atividade das Caspases. Dados expressos em média (\pm desvio padrão). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

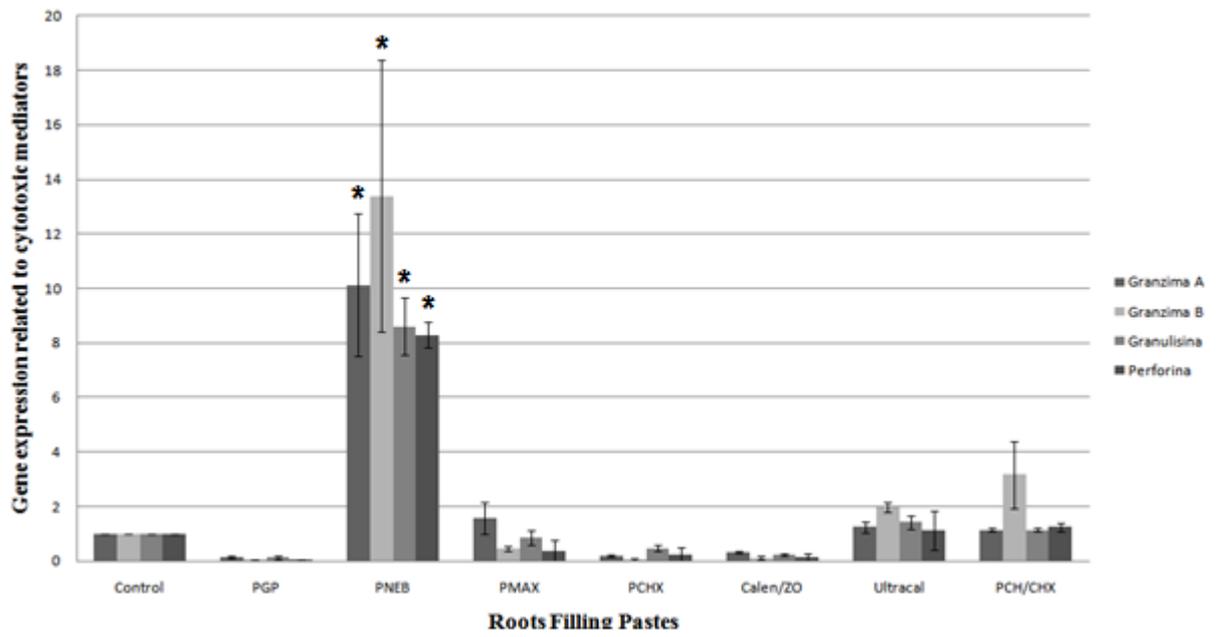


Figura 4. Resultados da Expressão Relativa dos genes dos Mediadores Citotóxicos. Dados expressos em média (\pm desvio padrão). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O material obturador de canal radicular deve ser selecionado a partir de parâmetros físicos e biológicos que envolvem os vários aspectos da biocompatibilidade, como a toxicidade local e sistêmica, sendo a citotoxicidade um dos aspectos da biocompatibilidade.

Esta dissertação avaliou o comportamento biológico de pastas obturadoras Iodoformadas (inclusive indicando novas propostas de associações farmacológicas) e a base de Hidróxido de Cálcio, para dentes decíduos, por meio da Biologia Molecular, em células mononucleadas de sangue periférico. Nossos resultados demonstraram que a maioria das pastas avaliadas demonstraram um comportamento citocompatível, com exceção da formulação da pasta Iodoformada com Clorexidina.

Apesar das limitações dos testes primários *in vitro* - não podemos extrapolar para a clínica esses resultados - o primeiro passo foi dado para dar continuidade a sequência de estudos que venham validar o uso dos materiais avaliados e, assim, indicá-los clinicamente.

BIBLIOGRAFIA

AAPD - American Academy on Pediatric Dentistry. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. Disponível em http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/G_Pulp.pdf. Acesso em : 24 nov. 2014.

AHMED HM. Pulpectomy procedures in primary molar teeth. **European Journal General Dentistry**, v. 3, p. 3-10, jul. 2014.

AMINABADI, N. A.; FARAHANI, R. M. Z.; GAJAN, E. B. Study Of root canal accessibility in humam primary molars. **Journal of Oral Science**, v. 50, n. 1, p. 69-74, mar. 2008.

ANDOLFATTO, C. et al. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. **International Scholarly Research Notices: Dentistry**, 2012, p.1-6, dec. 2012.

ANTONIAZZI B.F. et al. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1-6, dec. 2015.

ATHANASSIADIS, B. et al. An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an agar well diffusion assay. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 2, p. 141-6, jun. 2009.

AYDOS, J. H.; MILANO, N. F. Revisão bibliográfica sobre o uso do iodofórmio em endodontia. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 26, p. 43-51, mar. 1984.

BARBIN, L.E. et al. Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4-nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 664-8, mai. 2013.

BARTELSTONE, HJ. Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. **JournaL of Dental Research** v.30, n. 5, p. 728-33, out. 1951.

BERGOLI, A.D.; PRIMOSCH, R.E.; DE ARAUJO, F.B.; ARDENGHI, T.M.; CASAGRANDE L. Pulp therapy in primary teeth--profile of teaching in Brazilian dental schools. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.35, n. 2, p. 191-6. 2010.

BLANSCET, M. L.; TORDIK, P. A.; GOODELL, G. G. An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 10, p. 1246-1248, out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SBBrazil. Distrito Federal, 2011.

CABRAL, C.T.; FERNANDES, M.H. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. **Clinical Oral Investigation**, v. 11, n. 2, p. 155-164, Jun. 2007.

CERQUEIRA, D. F. et al. Cytotoxicity, histopathological, microbiologicalclinical aspects of an endodontic iodoform-based paste used in pediatric dentistry: a review. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 105–110. 2008.

CHAOLLÁI, N.I.; MONTEIRO, J.; DUGGAL, M.S. The teaching of management of the pulp in primary molars in Europe: a preliminary investigation in Ireland and the UK. **European Archives Paediatric Dentistry**, v.10, n.2, p. 98-103, jun. 2009.

CIAPETTI, G. et al. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials** v. 14, n. 5, p. 359-54, abr. 1983.

DAMMASCHKE, T. et al. Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 63, n. 3, p. 143-52, jun. 2005.

DENG, A. et al. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. **Journal of Immunology**, v.174, n.9, p. 5243-8, mai. 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological method**. v. 89, n. 2, p. 271-77, mai. 1986.

DESAI, S.; CHANDLER N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 4, p. 475-80, abr. 2009.

DIANAT, O.; AZADNIA, S.; MOZAYENI, M.A .Toxicity of Calcium Hydroxide Nanoparticles on Murine Fibroblast Cell Line. **Iranian Endodontic Journal**, v.10, n.1, p. 49-54. 2015.

DUNSTON, B.; COLL, J. A. A survey of primary tooth pulp therapy as taught in US dental schools and practiced by diplomates of the American Board of Pediatric Dentistry. **Pediatric Dentistry**, v. 30, n. 1, p. 42-48, jan. 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495–516, maio 2007.

FARACO-JUNIOR, I. M.; PERCINOTO, C. Avaliação de duas técnicas de pulpectomias em dentes decíduos. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 52, n. 5, p. 400-404. 1998.

FAVA, L.R.; SAUNDERS, W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 4, p. 257-82, ago. 1999.

FISCHER, U.; JÄNICKE, R. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death & Differentiation**, v.10, n.1, p. 76-100, jan. 2003.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B.T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, 1882-91, jul. 2010.

GEURTSSEN W. Biocompatibility of root canal filling materials. **Australian Endodontic Journal**, v. 27, n. 1, p. 12-21, abr. 2001.

GOMES, B.P.F.A. et al. Chlorhexidine in Endodontics. **Brazilian Dental Journal**, v.24, n. 2, p. 89-102. 2013.

GUEDES-PINTO, A. C.; PAIVA, J. G.; BOZZOLA, J. R. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 240-245. 1981.

GUPTA D, GREWAL N. Root canal configuration of deciduous mandibular first molars an in vitro study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 23, n. 3, p.134-7. 2005.

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, n. 2, p. 75-85, fev. 2003.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature** v. 407, n. 6805, p. 770–6, out. 2000.

HUANG, T. H.; DING, S. J.; KAO, C. T. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80, n. 2, p. 486-490, fev. 2007.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

KOBAYASHI, M. et al. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. **Odontology**, v.101, n.1, p.43–51, jan. 2013.

KUMAR, J. et al. Granulysin: a novel antimicrobial. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v.10, n.2, p. 321-9, fev. 2001.

LACATIVA, A.M. et al. Histological Evaluation of Bone Response to Pediatric Endodontic Pastes: An Experimental Study in Guinea Pig. **Brazilian Dental Journal**, v.23, n.6, p. 635-644. 2012.

LEE, T.H. et al. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. **International Endodontic Journal** v. 43, n. 5, p.430-35, maio, 2010.

LEONARDO, M.R. et al. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n. 1, p. 69-74. 2003.

LEONARDO, M.R. et al. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.102, n.5, p. 680-85, nov. 2006.

LI, Y.C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages *in vitro*. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 452-8, abr. 2012.

LIU, C.H. et al. Over expression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.18563-69, maio, 2001.

LONGUI, L.N.A. **Avaliação da participação das células NK (células cd56+) na resposta ao Paracoccidioides Brasiliensis** (Dissertação). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

LOPES-MAROTTI, N. R. **Análise da citotoxicidade in vitro da pasta Guedes-Pinto após diferentes condições de armazenamentos e tempos de preparo sobre cultura de fibroblastos NIH-3T3**. 2003. Tese de Doutorado (Faculdade de Odontologia). Universidade de São Paulo, São Paulo 2003.

MA, H. et al. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v. 3, n.2, p.1-15. 2006.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: **Citogenética Humana**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MARTINVALET, D. et al. Granzyme A Cleaves a Mitochondrial Complex I Protein to Initiate Caspase-Independent Cell Death. **Cell**, v. 16, n. 2, p. 681-92, maio, 2008.

MICHEL, J. A.; GUEDES-PINTO, A. C.; ARAÚJO, V. C. Estudo histopatológico de reação do subcutâneo de camundongos submetidos à ação de pasta obturadora utilizada na terapia endodôntica de dentes decíduos. **Revista de Odontologia da Faculdade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 65-72, 1985.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P.V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 44, n.4, p. 288-302, abr. 2009.

MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P.M.H. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 8, p. 697-730, ago. 2011.

MONTAGNER, G. F. S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**. v. 24, p. 1410-1416, ago. 2010.

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

NELSON FILHO, P. et al. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. **International Endodontic Journal**, v. 32, n.4, p. 303-11, ago. 1999.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 444-52, set. 2006.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS JP. Principles and technical aspects of PCR amplification. 1. ed. **Springer**, 2008.

PERSECHINI, P.M.; YOUNG, J.D.E.; ALMERS, W. Membrane channel formation by the lymphocyte pore-forming protein: comparison between susceptible and resistant target cells. **The Journal of Cell Biology**, v.110, n. 6, p. 2109-16, jun. 1990.

PETERS, O. A. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 3, p. 195-197, mar. 2013.

PIRES, C.W. **Indução de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade por pastas obturadoras para dentes decíduos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

QIAO-JING, L.; YONG-SHENG, L.; XIU-FENG, G. A Novel Analysis Method Dehydrogenase Activity in Serum Samples Based on Fluorescence Capillary Analysis. **Analytical Science**, v. 31, n. 5 p. 413-19. 2015.

QUEIROZ, A. M. et al. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 4, p. 290-296. 2011.

RIBEIRO, D.A. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, n.2, p. 251-6, fev. 2008.

RAI, N. K. et al. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 4, n.2, p. 138–44, set. 2005.

RODD, H.D. et al. Pulp therapy for primary molars. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.16, p.15-23, set. 2006.

ROSSIGNOL, R. et al. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, p. 985 - 993, fev. 2004.

SAGRILLO, M.R. et al. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p.741-8, abr. 2015.

SANCHEZ, I.R. et al. Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Surgery Journal**, v.17, n. 4, p. 182-85, jul. 1988.

SANTOS, E. M. **Análise da citotoxicidade *in vitro* de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos**: estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos. 1998. 151 f. Dissertação (Mestrado Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SARIGOL, C.G. et al. Cytotoxic effects of primary tooth root canal filling materials on L929 cell line. **Journal of Dentistry for Children**, v.77, n. 2 , p.72-6, maio, 2010.

SEMENOFF, T.A.; SEMENOFF SEGUNDO, A.; DE FIGUEIREDO, J.A. Biocompatibility of different intracanal medications in rat bucal submucosa tissue. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 1, p. 12-7, jan. 2008.

SILVA, L.A.B.; LEONARDO, M.R.; OLIVEIRA, D.S.B. et al. Histopathological Evaluation of Root Canal Fillingn Materials for Primary Teeth. **Brazilian Dental Journal**, v.21, n. 1, p.38-45, jan. 2010.

SILVA, R.A.B. et al. Subcutaneous Tissue Response of Isogenic Mice to Calcium Hydroxide-Based Pastes with Chlorhexidine. **Brazilian Dental Journal**, v.20, n.2, p. 99-106. 2009.

SIRÉN, E.K. et al. Ca(OH)₂ application modes: invitro alkalinity and clinical effect on bacteria. **International Endodontic Journal**, v.47, n. 7, p. 628-38, jul. 2014.

STENGER, S.; MODLIN R.L. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. **Current opinion in immunology**, v.10, n.4, p. 471-7, ago. 1998.

TOLEDO, R. et al. Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio no tratamento endodôntico de dentes com Rizogênese Incompleta. **International Journal Dental**, v.9, n. 1, p. 28-37, jan. 2010.

TRAIRATVORAKUL, C.; CHUNLASIKAIWAN, S. Success of Pulpectomy With Zinc Oxide-Eugenol Vs Calcium Hydroxide/Iodoform Paste in Primary Molars: A Clinical Study. **Pediatric dentistry**, v. 30, n. 4, p.330-308, jul. 2008.

TROWBRIDGE, H.O. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. **Journal of Endodontics**, v. 16, n. 2, p. 54-61, fev.1990.

TUCKER, M.J. The systemic toxicity evaluation of dental materials. **International Endodontic Journal**, v. 14, n. 1, p. 49-52, jan.1981.

WANG,X.L. et al. The study of cytotoxicity of different intracanal medications and cell rehabilitation on human periodontal ligament fibroblasts. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v.16, n. 5, p. 512-9, out. 2007.

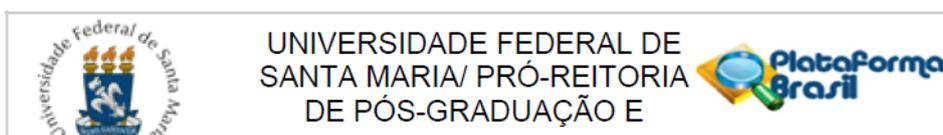
WHEATER, M.A. et al. Chlorhexidine, ethanol, lipopolysaccharide and nicotine do not enhance the cytotoxicity of a calcium hydroxide pulp capping material. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 11, p. 989-95, nov. 2012.

ZAPATA, J.M. et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 26, p. 24242-52, jun. 2001.

ZIMMERMAN, E.; LAHAV, A. Ototoxicity in preterm infants: effects of genetics, aminoglycosides, and loud environmental noise. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 1, p. 3-8, jan. 2013.

ANEXOS

Anexo A – Carta de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Toxicidade de materiais endodônticos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos.

Pesquisador: Juliana Rodrigues Praetzel

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 20457313.7.0000.5346

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 661.458

Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se da solicitação de uma emenda ao projeto intitulado "Toxicidade de materiais endodônticos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos", sob responsabilidade de Juliana Rodrigues Praetzel, aprovado sob o CAAE 20457313.7.0000.5346.

A justificativa para solicitação da emenda é ter havido introdução de outros materiais usados na terapia pulpar de dentes decíduos para avaliação de sua toxicidade a fim de que mais trabalhos sejam realizados.

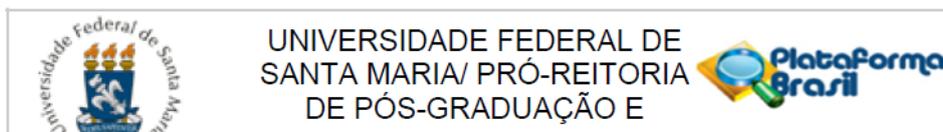
Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade in vitro de soluções irrigantes e pastas obturadoras para tratamento endodôntico em dentes decíduos frente a células-tronco da polpa de dentes decíduos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: É citado que o material usado é oriundo de um banco de células-tronco e células oriundas

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: 661.458

de material de descarte, sem identidade do doador, portanto não haverá acesso aos dados de identidade ou a outras informações dos pacientes que forneceram o material biológico, sem risco para o mesmo.

BENEFÍCIOS: conhecimento sobre o tema estudado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apesar de ser citado que houve solicitação de emenda ao projeto devido à introdução de outros materiais a serem testados, estes materiais não aparecem nas informações básicas do projeto, na plataforma Brasil, onde a metodologia proposta continua a mesma do projeto original.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos requeridos foram apresentados.

Recomendações:

.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram inseridas as informações referentes aos novos materiais a serem testados.

Apenas no novo cronograma apresentado, em forma de anexo, consta a observação "curativo de demora". Contudo, entende-se que devido se tratar de um estudo "in vitro", a introdução deste novo reagente não acarretará riscos ao sujeito de pesquisa.

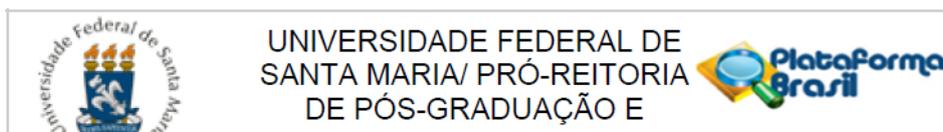
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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: 661.458

SANTA MARIA, 26 de Maio de 2014

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

Anexo B – Normas para publicação no periódico *International Endodontic Journal*

Author Guidelines

GENERAL

International Endodontic Journal publishes original scientific articles, reviews, clinical articles and case reports in the field of Endodontology; the branch of dental sciences dealing with health, injuries to and diseases of the pulp and periradicular region, and their relationship with systemic well-being and health. Original scientific articles are published in the areas of biomedical science, applied materials science, bioengineering, epidemiology and social science relevant to endodontic disease and its management, and to the restoration of root-treated teeth. In addition, review articles, reports of clinical cases, book reviews, summaries and abstracts of scientific meetings and news items are accepted.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *International Endodontic Journal*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

ETHICAL APPROVALS

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study. The authors **MUST** upload a copy of the ethical approval letter when submitting their manuscript. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Scientific Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original Scientific Articles must conform to the highest international standards in the field.

1. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

1.1. Format

Language: The language of publication is English. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or reference for publication

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their research findings or clinical reports so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable. Abbreviations should also be kept to a minimum, particularly those that are not standard. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Abbreviations: International Endodontic Journal adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

1.2. Structure

All manuscripts submitted to *International Endodontic Journal* should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page: The title page should bear: (i) Title, which should be concise as well as descriptive; (ii) Initial(s) and last (family) name of each author; (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed; (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces); (v) No more than six keywords (in alphabetical order); (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of author responsible for correspondence.

Abstract for Original Scientific Articles should be no more than 250 words giving details of what was done using the following structure:

- **Aim:** Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- **Methodology:** Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.
- **Results:** Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.
- **Conclusions:** State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.

Main Text of Original Scientific Article should include Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.

(i) **Clinical Trials** should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist and flow diagram (as a Figure) should also be included in the submission material.

(ii) **Experimental Subjects:** experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European

Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (Company, town/city, state, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Conclusion: should contain a summary of the findings.

Acknowledgements: *International Endodontic Journal* requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed. Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

1.3. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by *et al.* is sufficient, e.g. (Tobias *et al.* 1991). If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by "," e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias *et al.* 1991).

Reference list: All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

- (i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first three and add *et al.*
- (ii) Year of publication in parentheses
- (iii) Full title of paper followed by a full stop (.)
- (iv) Title of journal in full (in italics)
- (v) Volume number (bold) followed by a comma (,)
- (vi) First and last pages

Examples of correct forms of reference follow:

Standard journal article

Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M (1991) Class II antigen-expressing cells in experimentally induced pulpitis. *International Endodontic Journal* **24**, 8-14.

Corporate author

British Endodontic Society (1983) Guidelines for root canal treatment. *International Endodontic Journal* **16**, 192-5.

Journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M (1979) Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* **54** (Suppl. 1), 26a.

Books and other monographs

Personal author(s)

Gutmann J, Harrison JW (1991) *Surgical Endodontics*, 1st edn Boston, MA, USA: Blackwell Scientific Publications.

Chapter in a book

Wesselink P (1990) Conventional root-canal therapy III: root filling. In: Harty FJ, ed. *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn; pp. 186-223. London, UK: Butterworth.

Published proceedings paper

DuPont B (1974) Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Rematology; pp. 44-46. Houston, TX, USA: International Society for Experimental Hematology.

Agency publication

Ranofsky AL (1978) Surgical Operations in Short-Stay Hospitals: United States-1975. DHEW publication no. (PHS) 78-1785 (Vital and Health Statistics; Series 13; no. 34.) Hyattsville, MD, USA: National Centre for Health Statistics.8

Dissertation or thesis

Saunders EM (1988) *In vitro* and in vivo investigations into root-canal obturation using thermally softened gutta-percha techniques (PhD Thesis). Dundee, UK: University of Dundee.

URLs

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text.

Smith A (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html>. [accessed on 7 november 2003]

1.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated

to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Figure legends: Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

Permissions: If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.