

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

**TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E  
ASSOCIAÇÕES FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS  
NA PULPECTOMIA DE DENTES DECÍDUOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Graziela Botton**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E  
ASSOCIAÇÕES FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS NA  
PULPECTOMIA DE DENTES DECÍDUOS**

**Graziela Botton**

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<sup>a</sup>. Dra. Juliana Rodrigues Praetzel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

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

Botton, Graziela  
TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E ASSOCIAÇÕES  
FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS NA PULPECTOMIA DE DENTES  
DECÍDUOS / Graziela Botton.-2014.

51 p. ; 30cm

Orientadora: Juliana Rodrigues Praetzel  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2014

1. dente decíduo 2. irrigantes do canal radicular 3.  
pulpectomia 4. testes de toxicidade I. Rodrigues  
Praetzel, Juliana II. Título.

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

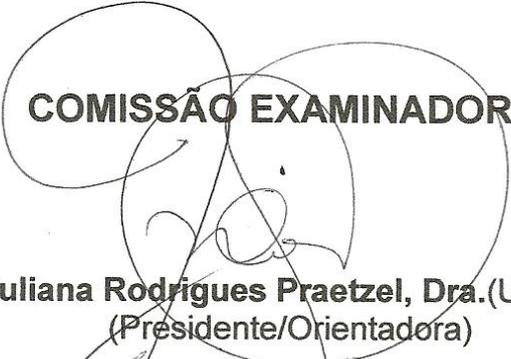
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E ASSOCIAÇÕES  
FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS NA PULPECTOMIA DE DENTES  
DECÍDUOS**

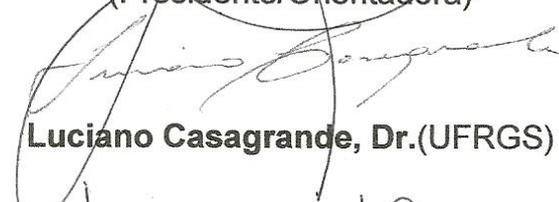
elaborada por  
**Graziela Botton**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



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



**Luciano Casagrande, Dr.(UFRGS)**



**Rachel de Oliveira Rocha, Dra.(UFSM)**

Santa Maria, 05 de agosto de 2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ricardo** e **Nara**, por me ensinarem que o estudo é a base de tudo e sempre apoiarem as minhas decisões; aos meus irmãos, **Ricardo** e **Andressa**, exemplos de esforço e dedicação; e ao meu noivo, **Jorge**, por resgatar o meu sorriso nos momentos de aflição.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ricardo e Nara**, por apoiarem e incentivarem a busca pelos meus sonhos, por estarem sempre ao meu lado me dando segurança, e aos meus irmãos, **Ricardo e Andressa**, por serem exemplos de dedicação e sucesso. Vocês me completam.

Ao meu noivo **Jorge**, pelo cuidado durante todo esse tempo, pela paciência nos momentos mais difíceis e compreensão ao meu isolamento por várias horas, não desistindo de me fazer sorrir. Te amo.

À minha cunhada, **Ana Paula Streck**, por ser um exemplo de determinação.

À minha sogra, **Carmen Silva** e à minha cunhada, **Ana Paula Silva**, pelo carinho e incentivo.

Às minhas amigas **Caroline Schneider** (Kika), **Letícia Lauzer** e **Paula Scremin**, por todos os encontros cheios de alegria e por me manterem informada das novidades nos momentos de ausência, com adesão total do grupo ao “zap zap”.

À amiga **Leticia Frantz** que, apesar da distância, sempre esteve presente com palavras de incentivo.

Às colegas do mestrado **Iana Lamadrid** e **KalineThumé Antunes**, companheiras dos cafés, que com seus sorrisos recarregaram a minha energia.

Em especial à colega **Carine Weber Pires**, amiga para sempre, pela parceria nos cafés, pelas confidências, pelas palavras certas, pelas risadas e pelas lágrimas, pelo ombro amigo sempre à disposição e pelo incentivo quando eu não aguentava mais. Amiga que esteve comigo todos os dias numa sintonia surpreendente suportando todas as “lagartas”, enfim estamos apreciando a beleza das borboletas...

À minha orientadora, **Juliana Rodrigues Praetzel**, pelas oportunidades dadas desde a graduação, como o atendimento a bebês, despertando em mim uma verdadeira paixão pela Odontopediatria. Por todos os ensinamentos durante o mestrado, a confiança em meu trabalho e por me incentivar a continuar. Depois de tanto tempo de convívio, agradeço também pela amizade, pelas conversas, por ser

um exemplo de profissional e uma pessoa que está sempre ensinando, através da postura e elegância. Obrigada.

Agradeço à **Universidade Federal de Santa Maria** pela qualidade do ensino público e gratuito, para **Coordenação e docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** que sempre estiveram buscando melhorar o ensino e a qualidade do mestrado.

Aos professores do PPGCO, em especial ao **Thiago Machado Ardenghi**, por ensinar de uma maneira brilhante, me fazendo entender assuntos que antes eram dilemas.

Aos professores da Odontopediatria, em especial à **Marta Dutra Machado Oliveira** e à **Rachel de Oliveira Rocha**, por estarem sempre disponíveis em ajudar e ensinar com delicadeza, e claro, pela amizade.

Aos colegas da Odontopediatria, **Bernardo Agostini, Brenda Nakashima, Bruna Antoniazzi, Bruno Emmanuelli, Fernanda Tomazoni, Flávia Vieira, Gabriel Nicoloso, Janessa Engelmann, Yassmín Ramadan**, pelo bom humor contagiante de “odontopediatras” que fazem as clínicas e estágios serem tão animados.

À professora **Michele Rorato Sagillo**, pela disponibilidade e pelos ensinamentos. Sua ajuda foi essencial para concretizar esse trabalho.

Aos pesquisadores do laboratório de Biogenômica/UFSM, **Alencar Kolinski, Francine Cadoná e Verônica Azzolin**, pelo interesse, disponibilidade e parceria na realização deste trabalho.

À funcionária **Jéssica Dalcin da Silva**, pela disponibilidade, paciência e competência para resolver os imprevistos.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desse trabalho e para a minha formação.

## RESUMO

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

### TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E ASSOCIAÇÕES FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS NA PULPECTOMIA DE DENTES DECÍDUOS

AUTORA: GRAZIELA BOTTON

ORIENTADORA: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de agosto de 2014.

As soluções irrigantes empregadas na pulpectomia de dentes decíduos são coadjuvantes essenciais no preparo químico mecânico, por entrarem em contato com os tecidos dentários e periapicais, é fundamental a avaliação da biocompatibilidade das mesmas. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade, *in vitro*, de soluções irrigantes e associações farmacológicas empregadas na sanificação dos canais radiculares desses dentes, realizando quatro testes que avaliaram a toxicidade analisando diferentes parâmetros. Foram realizados os Testes de Viabilidade Celular (MTT), Peroxidação Lipídica (TBARS), GEMO e Ensaio Cometa Alcalino, na avaliação das soluções principais: Hipoclorito de Sódio 1% e 2,5%, e Clorexidina 2%; e soluções auxiliares: Ácido Cítrico 6% e EDTA 17% e das associações entre as soluções principais e auxiliares, frente às células mononucleadas do sangue periférico humano (MTT, TBARS e Ensaio Cometa Alcalino), em 24h e 72h, e frente ao dsDNA, DNA de timo de bezerro purificado (GEMO). Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade pelo Kolmogorov-Smirnov e analisados por Anova seguido do post hoc de Dunnett, e Kruskal-Wallis seguido do post hoc de Dunn. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foi observado em 24h, redução na viabilidade celular em todos os grupos. Em 72h a redução se manteve, exceto no EDTA, associações do Hipoclorito de Sódio (1% e 2,5%) com EDTA ( $p < 0,05$ ) e Clorexidina com EDTA ( $p > 0,05$ ). Causaram lipoperoxidação em 24h, EDTA e Hipoclorito de Sódio 2,5% com EDTA e, em 72h, Hipoclorito de Sódio (1% e 2,5%) e as três associações com Ácido Cítrico ( $p < 0,05$ ). Todos os grupos causaram quebra no DNA pelo Ensaio Cometa Alcalino, 24h e 72h ( $p < 0,05$ ). No Teste GEMO foi observado dano ao dsDNA em todos os grupos ( $p < 0,05$ ), exceto Clorexidina com EDTA. Foi observado algum nível de toxicidade em todos os grupos testados. Entretanto, a Clorexidina entre as soluções principais, e o EDTA entre as auxiliares, foram menos citotóxicas. Também, a associação dessas duas soluções apresentou menor potencial de toxicidade. A partir dos resultados ficou demonstrado a melhor biocompatibilidade *in vitro* da associação de Clorexidina e EDTA.

**Palavras-chave:** Dente decíduo. Irrigantes do canal radicular. Testes de toxicidade.

## **ABSTRACT**

Masters Dissertation  
Dentistry Science Post-Graduation Program  
Federal University of Santa Maria

### **TOXICITY OF IRRIGANT SOLUTIONS AND PHARMACOLOGICAL ASSOCIATIONS USED IN PULPECTOMY OF PRIMARY TEETH**

AUTHOR: GRAZIELA BOTTON

TUTOR: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL

Date and Local of Defense: Santa Maria, August 5<sup>th</sup>, 2014.

The irrigating solutions used in primary teeth pulpectomies are essential supporters in chemical mechanic preparation, for they come in contact with the dental and periapical tissues, evaluating their biocompatibility is necessary. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used for sanitizing the root canals of these teeth, by conducting four tests that evaluated the toxicity according to different parameters. Tests of Cell Viability (MTT), Lipid Peroxidation (TBARS), GEMO and Alkaline Comet Assay were performed in the evaluation of major solutions - 1% and 2.5% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine -, auxiliary solutions - 6% Citric Acid and 17% EDTA - and of the associations between major and auxiliary solutions, exposing both human peripheral blood mononuclear cells (MTT, TBARS and Alkaline Comet Assay) in 24h and 72h, and exposing dsDNA, purified calf thymus DNA (GEMO). Data were assessed for normality by Kolmogorov-Smirnov and analyzed by ANOVA followed by post hoc Dunnett's, and Kruskal-Wallis test followed by post hoc Dunn. Values showing  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Reduction in cell viability was observed in all groups at 24 hours. At 72 hours the reduction has continued, except for EDTA, combinations of (1% and 2.5%) sodium hypochlorite with EDTA ( $p < 0.05$ ) and Chlorhexidine with EDTA ( $p > 0.05$ ). EDTA and 2.5% sodium hypochlorite with EDTA caused lipid peroxidation in 24h, and 1% and 2.5% sodium hypochlorite and three associations with citric acid ( $p < 0.05$ ) had the same effect in 72h. All groups have caused breaks in DNA by Alkaline Comet Assay, 24h and 72h ( $p < 0.05$ ). In the GEMO Test, dsDNA damage was observed in all groups ( $p < 0.05$ ), except for Chlorhexidine with EDTA. Some degree of toxicity was observed in all tested groups. However, Chlorhexidine, among the major solutions, and EDTA, among the auxiliary solutions, were less cytotoxic. Also, the association of these two solutions had less potential toxicity. The results demonstrated the best *in vitro* biocompatibility in the combination of Chlorhexidine and EDTA.

**Keywords:** Deciduous teeth. Root canal irrigants. Toxicity test.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Ácido Cítrico

BHT – Butil-hidróxitolueno

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CHX – Clorexidina

CMSP – Células Mononucleadas do Sangue Periférico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – DNA dupla fita

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

MDA – Malondialdeído

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

PBS – Tampão fosfato-salino

SL – *Smear Layer*

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TE – Tampão tris-EDTA

Tris-HCl – Tampão base Tris (hidroxilamina) aminometano-ácido clorídrico

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVO</b> .....	16
<b>3. ARTIGO</b> .....	17
<b>Resumo</b> .....	18
<b>Introdução</b> .....	19
<b>Materiais e Métodos</b> .....	20
<b>Resultados</b> .....	25
<b>Discussão</b> .....	26
<b>Conclusão</b> .....	31
<b>Referências</b> .....	32
<b>Figuras</b> .....	36
Figura 1 - Resultados do Teste MTT, em 24h e 72h.....	36
Figura 2 - Resultados do Teste TBARS, em 24h e 72h.....	36
Figura 3 - Resultados do Ensaio Cometa, em 24h e 72h.....	37
Figura 4 - Resultados do Teste GEMO.....	37
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
<b>ANEXOS</b> .....	45
<b>Anexo A</b> - Carta de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	45
<b>Anexo B</b> - Normas para publicação no periódico <i>International Endodontics     Journal</i> .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Quando há comprometimento pulpar irreversível do dente decíduo, por evolução da doença cárie ou trauma, este necessita da terapia pulpar radical, a pulpectomia. Nessa técnica a limpeza do sistema de canais radiculares através do preparo químico-mecânico é um passo fundamental para obter a sanificação dos mesmos (RODD et al., 2006). Frente à morfologia do sistema de canais desses dentes (WANG et al., 2013; AHMED, 2013), as soluções irrigantes desempenham um papel significativo na eliminação de microrganismos, na dissolução de tecidos orgânicos e inorgânicos, e na remoção de detritos, entre eles a *Smear Layer* (BARCELOS et al., 2012).

Não há um consenso entre os protocolos de irrigação estabelecidos para pulpectomias em dentes decíduos, nem uma solução que, sozinha, apresente todas as propriedades necessárias, sendo empregadas diferentes substâncias e associações. O Hipoclorito de Sódio tem sido o irrigante de escolha para limpeza da malha canalicular, tanto em dentes decíduos como em dentes permanentes, e sua eficácia tem sido demonstrada tanto a 1% como a 2,5% (SASSONE et al., 2008; BULACIO et al., 2006). O Digluconato de Clorexidina a 2% é uma alternativa como solução irrigante principal na instrumentação, com capacidade antimicrobiana similar ao Hipoclorito de Sódio e ainda a substantividade como propriedade específica (ERCAN et al., 2004; CARRILO et al., 2010).

A despeito de apresentarem excelente propriedade antimicrobiana, essas duas soluções irrigantes não são capazes de remover a *Smear Layer* - camada de detritos orgânicos e inorgânicos, espalhada pelas paredes do canal radicular, formada após a instrumentação do mesmo, que impede a melhor penetração dos agentes desinfetantes possibilitando a permanência de bactérias nos túbulos dentinários (SHAHRAVAN et al., 2007). Assim, são necessárias substâncias irrigantes auxiliares, quelantes, para suprir essa necessidade, formando-se associações farmacológicas com as soluções principais, sendo o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 17% ou o Ácido Cítrico a 6%, as mais empregadas em Odontopediatria (PITONI et al., 2011; BARCELOS et al., 2012).

Quando utilizadas na pulpectomia dos dentes decíduos, a característica rizólise em bisel das raízes e a proximidade do dente permanente, logo abaixo da

região de furca, onde há com freqüências canais acessórios (CAMP, 2008; KUMAR, 2009), faz com que essas soluções estabeleçam íntimo contato com os tecidos dentários e periapicais (POORNIMA; REDDY, 2008), sendo fundamental a avaliação da biocompatibilidade das mesmas.

Ao selecionar um produto para ser utilizado clinicamente, deve-se observar sua eficácia e segurança. As soluções citadas anteriormente, já empregadas para uso clínico, tem suas eficácias comprovadas por um grande número de estudos (ERCAN et al., 2004; SASSONE et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2007; HARIHARAN et al., 2010; PITONI et al., 2010; BARCELOS et al., 2012).

Um material é biocompatível quando provoca uma reação biológica adequada ao ser aplicado a um organismo (WATAHA, 2001). Entretanto, não é adequado caracterizar um material, como biocompatível, por uma única metodologia Tang 1999. Para embasar a segurança deve ser realizada uma variedade de testes *in vitro* e ensaios *in vivo* que avaliem a biocompatibilidade dessas substâncias, analisando vários parâmetros, tais como citotoxicidade, histocompatibilidade, genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade.

A utilização de diferentes métodos para monitorar a toxicidade de um produto fornece informações mais completas, pois esta pode ser avaliada em diferentes parâmetros nas células (TANG et al., 1999).

A Citotoxicidade está relacionada ao grau, que um agente tem, de alguma ação destrutiva sobre certas células (PETERS, 2013), enquanto a genotoxicidade está relacionada ao dano que determinadas substâncias causam no DNA, estabelece o potencial mutagênico ou carcinogênico (RIBEIRO, 2008).

Ensaio de cito e genotoxicidade, *in vitro*, são os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, segundo o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993. Ensaio de genotoxicidade tem ampla aceitação como um indicador importante de carcinogenicidade (MARINS et al., 2012), realizados *in vitro* e *in vivo*, estes testes são destinados a detectar compostos que induzam a danos no DNA, mutação genética, quebra ou perda cromossômica, alteração na capacidade de reparo do DNA e a transformação celular (RIBEIRO et al., 2005).

O Teste MTT é um ensaio colorimétrico baseado na metabolização do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de cor amarelada, em cristais de formazan, roxo-azulado, essa reação ocorre através de

uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase, que permanece ativa apenas em células viáveis, estabelecendo assim parâmetros de citotoxicidade e viabilidade celular. Os resultados são quantificados colorimetricamente, lidos no espectrofotômetro e o valor das absorvâncias é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Outro parâmetro para verificar o potencial citotóxico de um produto é a avaliação, através do ensaio TBARS, da peroxidação lipídica, dano que o estresse oxidativo pode ocasionar na membrana celular (OHKAWA et al., 1979). O estresse oxidativo ocorre em decorrência de uma produção exacerbada de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) quando o sistema antioxidante não é o suficiente (BERRA et al., 2006). A produção de ERO é observada em diversas condições fisiológicas, sendo parte integrante do metabolismo humano, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor, tendo importante função biológica (VASCONCELOS et al., 2007). Entretanto ERO podem ser geradas de modo acentuado pela exposição celular a um produto exógeno tóxico, podendo levar a resultados bastante danosos às células (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Os alvos principais das ERO são o DNA, além das proteínas e os fosfolipídios da membrana celular (BERRA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Quando os alvos são os fosfolipídios, há como produto dessa lipoperoxidação o malondialdeído, que reage com o ácido tiobarbitúrico no Ensaio TBARS (OHKAWA et al., 1979).

O Ensaio Cometa Alcalino é um método de investigação do dano genético associado à ação de agentes potencialmente genotóxicos às células, avaliando a quebra de cadeias de DNA (MALUF; RIEGEL, 2011). Denomina-se Cometa, pois em condição alcalina há desnaturaçã, separando o DNA dupla fita, assim as alças de DNA fita simples, que contenham quebras, migram em direção ao ânodo, formando imagens semelhantes a “cauda do cometa” visível sob microscopia óptica. O tamanho da “cauda” observada será conforme o dano ao DNA, quanto maior a quebra, maior “cauda” (MALUF; RIEGEL, 2011). Os danos são classificados, e ilustrados em categorias (GARCÍA et al., 2004).

Outro método disponível de avaliação do potencial genotóxico de um produto é o Teste de Capacidade Genomodificadora (GEMO), um método de avaliação, simples, rápido e preciso, que permite a análise da potencial capacidade mutagênica de um produto, sem interferências de variáveis metabólicas celulares, proposto pelo laboratório de Biogenômica da UFSM, em 2013 (CADONÁ, 2013).

Apesar de diversos estudos terem testado a toxicidade das soluções irrigantes principais e auxiliares mais empregadas na pulpectomia de dentes decíduos, parece não haver um consenso na literatura, sobre essa propriedade nesses materiais. Os resultados contraditórios podem ser consequência da variedade nas concentrações das soluções testadas, das diferentes metodologias e tipos celulares utilizados nos trabalhos realizados (CHAN et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005; MALHEIROS et al., 2005; GÜL et al., 2009; LEE et al., 2010; AUBUT et al., 2010; SAGHIRI et al., 2011). Além disso, poucas pesquisas empregaram uma variedade de testes para avaliação de biocompatibilidade num mesmo estudo. Também há escassez de ensaios testando a genotoxicidade desses irrigantes e ausência de avaliações sobre soluções associadas, sendo necessária a realização de testes para uma melhor compreensão do risco potencial para a saúde, inerentes a estes agentes utilizados na prática odontológica (RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005).

As Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) tem sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos citotóxicos e genotóxicos. Por serem abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo *in vitro* bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem celular em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (MALUF; RIEGEL, 2011).

Neste trabalho, foram executados quatro testes, *in vitro*, para inferirem resultados complementares em relação à citotoxicidade, através da viabilidade celular e do estresse oxidativo, e a genotoxicidade das soluções irrigantes e associações farmacológicas, empregadas na terapia endodôntica de dentes decíduos, frente às CMSP, a fim de embasar a segurança dessas substâncias utilizadas na clínica odontopediátrica.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade, *in vitro*, de soluções irrigantes e associações farmacológicas empregadas em diferentes protocolos de irrigação na pulpectomia de dentes decíduos.

### 3. ARTIGO

#### TOXICIDADE DE SOLUÇÕES IRRIGANTES E ASSOCIAÇÕES FARMACOLÓGICAS EMPREGADAS NA PULPECTOMIA DE DENTES DECÍDUOS.

**Graziela Botton<sup>1</sup>, Carine Weber Pires<sup>1</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>2</sup>, Francine  
Carla Cadoná<sup>2</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>2</sup>,  
Michele Rorato Sagrillo<sup>3</sup>, Juliana Rodrigues Praetzel<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria; <sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria; <sup>3</sup>Curso de Biomedicina, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

“Running title”: Toxicidade de irrigantes endodônticos

Palavras-chave: *dente decíduo*, irrigantes do canal radicular, pulpectomia, testes de toxicidade.

*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

Este artigo será submetido ao periódico *International Endodontics Journal* (julho 2014) – Anexo B

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a toxicidade *in vitro* de soluções irrigantes e associações farmacológicas empregadas na pulpectomia de dentes decíduos.

**Metodologia:** Os Testes de Viabilidade Celular (MTT), Peroxidação Lipídica (TBARS), GEMO e Ensaio Cometa Alcalino, foram realizados para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade das soluções: Hipoclorito de Sódio 1% e 2,5%, Clorexidina 2%, EDTA 17% e Ácido Cítrico 6%, que foram testadas, individualmente e em associações, frente às células mononucleadas do sangue periférico humano (MTT, TBARS e Ensaio Cometa), em 24h e 72h, e ao dsDNA, DNA de timo de bezerro purificado (GEMO). Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade pelo Kolmogorov-Smirnov e analisados por Anova seguido do post hoc de Dunnett, e Kruskal-Wallis seguido do post hoc de Dunn. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Resultados:** Em 24h todas as soluções irrigantes e associações farmacológicas reduziram viabilidade celular. Em 72h mantiveram redução, exceto o EDTA, Hipoclorito de Sódio (1% e 2,5%) com EDTA ( $p < 0,05$ ) e Clorexidina com EDTA ( $p > 0,05$ ). Causaram lipoperoxidação em 24h, EDTA e Hipoclorito de Sódio 2,5% com EDTA, e em 72h, Hipoclorito de Sódio (1% e 2,5%) e as três associações com Ácido Cítrico ( $p < 0,05$ ). Todos os grupos causaram quebra no DNA pelo Ensaio Cometa Alcalino, 24h e 72h ( $p < 0,05$ ). No Teste GEMO todos os grupos causaram dano ao dsDNA ( $p < 0,05$ ), exceto Clorexidina com EDTA.

**Conclusão:** Todos os grupos demonstraram algum nível de toxicidade. Das soluções principais a Clorexidina apresentou menor potencial de citotoxicidade, das auxiliares o EDTA foi menos citotóxico, e a associação dessas duas soluções demonstrou menor potencial de toxicidade entre os grupos avaliados.

## Introdução

Quando o dente decíduo necessita da pulpectomia, em decorrência de cárie ou trauma, a complexa morfologia do sistema de canais destes dentes traz dificuldades a uma adequada instrumentação (Wang *et al.* 2013, Ahmed *et al.* 2013), sendo significativo o papel das soluções irrigantes durante esta etapa para a eliminação de microrganismos, a dissolução de tecidos e a remoção de detritos, entre eles a *Smear Layer (SL)* (Rodd *et al.* 2006, Barcelos *et al.* 2012). Na ausência de uma solução que cumpra sozinha todas essas necessidades, são utilizadas associações farmacológicas entre soluções principais, antimicrobianas, e auxiliares, quelantes, com melhores resultados no processo de cura e regeneração dos tecidos dentários e periapicais (Barcelos *et al.* 2012), objetivo principal da terapia endodôntica (Chang *et al.* 2001).

O Hipoclorito de Sódio (NaOCl) 1% e 2,5% e o Digluconato de Clorexidina (CHX) 2% são irrigantes principais amplamente utilizados, com eficácia demonstrada na capacidade antimicrobiana, e propriedades específicas como a dissolução de tecidos no NaOCl e a substantividade na CHX (Ercan *et al.* 2004, Sassone *et al.* 2008, Bulacio *et al.* 2006, Carrilo *et al.* 2010). Entretanto, não são capazes de remover a *SL*, essencial para a difusão dos agentes desinfetantes nos túbulos dentinários (Shahravan *et al.* 2007). Assim, para suprir essa necessidade, são fundamentais associações com soluções auxiliares, quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17% e o ácido cítrico (AC) 6% (Pitoni *et al.* 2011, Barcelos *et al.* 2012).

Essas soluções estabelecem íntimo contato com os tecidos dentários e periapicais quando empregadas na pulpectomia (Poornima & Reddy 2008), especialmente em dentes decíduos que sofrem o processo de rizólise dificultando a definição do ápice anatômico (Camp 2008). Ainda, frequentemente, molares decíduos apresentam canais acessórios no assoalho da câmara pulpar, havendo a chance do irrigante alcançar a região de furca óssea, onde há presença do dente permanente em formação, uma preocupação adicional (Kumar 2009). Deste modo, é fundamental a avaliação da biocompatibilidade dessas soluções (Nishimura *et al.* 2008).

Para isso é aconselhado a realização de uma variedade de testes que analisem parâmetros diferentes (Tang *et al.* 1999), sendo os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, *in vitro*, os primeiros de uma sequência proposta pelo Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993. A citotoxicidade está relacionada ao grau, que um agente tem, de alguma ação destrutiva sobre certas células (Peters 2013), enquanto que a genotoxicidade está relacionada ao dano que determinadas substâncias causam no DNA e estabelece o potencial mutagênico ou carcinogênico (Ribeiro 2008).

Não há consenso na literatura sobre o potencial tóxico dessas soluções. Os resultados contraditórios encontrados podem estar relacionados às diferenças nas concentrações estudadas, às diferentes metodologias e tipos celulares utilizados nos ensaios (Lee *et al.* 2010), além disso, há escassez de estudos testando o efeito genotóxico desses irrigantes, como também a toxicidade das soluções associadas ainda não ter sido investigada.

Neste trabalho, foram realizados quatro testes, *in vitro*, que verificaram a citotoxicidade e a genotoxicidade através da análise de diferentes parâmetros, das soluções irrigantes principais e auxiliares e associações entre as mesmas, empregadas na pulpectomia em dentes decíduos. Avaliou-se as soluções nas concentrações empregadas na prática clínica, frente às Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) Humano, que vem sendo aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos citotóxicos e genotóxicos (Ciapetti *et al.*, 1993). A hipótese nula testada foi de que não haveria toxicidade nas soluções irrigantes e associações farmacológicas avaliadas.

## **Materiais e Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil (Nº CAAE 20457313.7.0000.5346), de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

## **Grupos experimentais**

Todas as soluções testadas foram manipuladas pela NOVA DERME farmácia de manipulação (Santa Maria-RS, Brasil) com o dobro da concentração, para que em contato com a cultura celular, durante o protocolo metodológico, fossem obtidas as concentrações pretendidas no estudo, semelhantes às aquelas usadas na clínica odontológica.

As soluções irrigantes foram efetivamente testadas nas concentrações: NaOCl 1%, NaOCl 2,5% e CHX 2%, AC 6% e EDTA 17%.

Distribuídas nos seguintes grupos: G1 - NaOCl 1%; G2 - NaOCl 2,5%; G3 - CHX 2%; G4 - AC 6%; G5 - EDTA 17%; G6 - NaOCl 1% e AC 6%; G7 - NaOCl 1% e EDTA 17%; G8 - NaOCl 2,5% e AC 6%; G9 - NaOCl 2,5% e EDTA 17%; G10 - CHX 2% e AC 6%; G11 - CHX 2% e EDTA 17% e G12 - Controle Negativo (CN).

## **Cultura celular**

Para a realização dos testes foram utilizadas CMSP humano, oriundas de amostras de sangue de descarte, de pacientes com idade média de 20 anos, não fumantes, não etilistas e sem uso de medicação crônica. Exceto no Teste Gemo, de genotoxicidade, onde foi utilizado DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA) obtido da Invitrogen (Eugene, OR, USA).

O material biológico de descarte, sangue, foi submetido ao procedimento de separação dos seus constituintes por grau de densidade, utilizando o reagente Ficoll Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) seguido de centrifugação a 1450 rpm durante 30 minutos, dessa forma, as células mononucleadas, foram separadas dos eritrócitos e plasma sanguíneo. As células obtidas, CMSP, foram distribuídas em placas de cultivo de 6 poços estéreis, contendo meio de cultivo RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino, suplementado conforme Peres & Curi (2005). As células foram cultivadas a uma densidade inicial de  $2 \times 10^5$  células/mL de material.

## **Tratamento das CMSP**

As suspensões celulares foram expostas às soluções irrigadoras e associações farmacológicas, e incubadas em estufa a 37°C por períodos de 24 e 72 horas. Para evitar interferência da coloração do meio de cultura no resultados dos testes, as amostras foram coletadas dos poços de cultura e centrifugadas em tubos

Falcon por 10 minutos a 2000 rpm, obtendo-se um pellet contendo as CMSP tratadas, as quais foram ressuspensas em 2mL de tampão fosfato-salino (PBS), para posterior realização dos testes de viabilidade celular (MTT), peroxidação lipídica (TBARS) e genotoxicidade (Cometa). Nesses testes, o controle negativo (CN) foi composto pelas CMSP em meio de cultura e PBS.

O dsDNA foi distribuído em placa preta de Elisa, e exposto às soluções, no momento do teste.

## **Avaliação da Citotoxicidade**

### **1. Avaliação da Viabilidade Celular pela Técnica de MTT**

Neste Ensaio, o reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, MTT, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é incorporado por células viáveis, que reduzem este composto, através da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazan, insolúveis em água e de coloração roxo-azulada, que fica armazenado no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizado pela adição do DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificado colorimetricamente, no espectrofotômetro. O valor das absorvâncias é proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986).

Assim, em uma placa de Elisa foi utilizado 200 µL de amostra e adicionado 20µL de reagente MTT (concentração de 5 mg/mL diluído em tampão fosfato pH 7,4). A placa foi incubada por 1 hora a temperatura de 37°C, posteriormente foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 200µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma®), a seguir foi centrifugada novamente, por 10 minutos a 2000 rpm, para que os cristais de formazan fossem liberados para o meio extracelular. O sobrenadante foi removido, e então a leitura dos dados foi efetuada. O teste foi realizado em triplicata e a absorvância foi quantificada colorimetricamente, através de espectrofotometria, em um comprimento de onda de 570nm. Foi calculada a média da triplicata para submeter à análise estatística.

### **2. Avaliação da Peroxidação Lipídica com o Ensaio TBARS**

A determinação da peroxidação lipídica foi avaliada através da observação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído (MDA), um produto secundário da reação de oxidação dos fosfolípidios da membrana celular,

reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando uma coloração detectada por espectrofotômetro (Ohkawa et al. 1979). Foi produzida uma curva de MDA para posterior determinação dos equivalentes de cada tratamento em questão. Após os tratamentos, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, para a retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e realizou-se 2 centrifugações com solução fisiológica (NaCl 0,9%) por 10 min a 2000 rpm. Após estas etapas o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de Butil-hidroxitolueno (BHT 10 mM), 500µL de ácido tricloroacético (TCA 20 %) e passou por uma última etapa de centrifugação por 5 minutos a 2000 rpm. Logo após a centrifugação, 900µL do sobrenadante foi misturado a um meio de reação contendo TBA 0,8% e incubados a 95°C, em banho Maria, por 1 hora. Após o resfriamento das amostras, foram feitas as leituras das absorbâncias no comprimento de onda de 532nm em espectrofotômetro. O teste foi realizado em triplicata e então, calculada a média, para submeter à análise estatística.

## **Avaliação da Genotoxicidade**

### **1. Ensaio Cometa Alcalino**

O Ensaio Cometa é um teste que possibilita quantificar os níveis de quebras de fitas simples de DNA. Foi realizado de acordo com Singh *et al.* (1988), modificado por García *et al.* (2004).

Sobre uma lâmina de vidro previamente coberta com uma camada de agarose 1,5%, foram depositadas as células tratadas e suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting*). O material foi imerso em solução de lise (89mL de solução de lise a 10mL de Dimetil-sulfóxido e 1mL de Triton X-100), para a remoção das membranas e citoplasma das células. Na sequência, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese alcalino com pH 13 (300 mM NaOH e 1mM EDTA em água destilada) e submetidas à eletroforese por cerca de 30 minutos, a 25V e 300mA. Posteriormente, foram realizados os processos de neutralização (tampão neutralizador com pH 7,5), fixação (solução fixadora composta de 15% de ácido tricloroacético) e coloração (nitrato de prata e carbonato de sódio a 5%), para então, o material genético ser analisado. Foram analisados cinquenta núcleos de cada lâmina, por dois avaliadores experientes, treinados, cegos, em microscópio óptico, em objetiva de 400 vezes, e classificados de acordo com o formato da imagem, em cinco categorias propostas por García *et al.* (2004), variando de 0

(nenhum dano) a 4 (dano máximo), incluindo também a classificação de apoptose celular. O teste foi realizado em duplicata e os dados foram transformados em índice de dano (Montagner *et al.*, 2010) para serem submetidos à análise estatística.

## **2. Teste de Capacidade Genomodificadora (GEMO)**

O Teste GEMO é um método de avaliação, *in vitro*, da Capacidade Genomodificadora de um determinado produto químico, ou seja, se o mesmo pode ser genoprotetor ou genotóxico. Permite a análise da potencial capacidade mutagênica de um produto, sem interferência de variáveis metabólicas celulares e fisiológicas. É realizado em placa preta de 96 poços, utilizando DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA) e o corante PicoGreen® (Invitrogen), altamente específico para DNA dupla fita (dsDNA), diluídos em tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 7,5). O corante PicoGreen® é um reagente fluorescente ultrasensível que possibilita a quantificação de dsDNA em solução. A leitura da fluorescência é realizada no aparelho Espectrofluorímetro. Produtos que causam quebras no dsDNA são identificados pela diminuição da fluorescência quando comparado com o grupo controle que há apenas o dsDNA de timo de bezerro (Cadoná, 2013).

Neste ensaio, realizado em triplicata, em cada poço da placa preta de Elisa, 10 µL de dsDNA de timo de bezerro em uma concentração determinada (1 µg/mL), foi exposto à 100 µL de solução irrigante ou associação farmacológica (foi acrescentado 90 µL de TE para obter-se o volume final de 200 µL), permanecendo em contato por 30 minutos. Após este tratamento, o corante PicoGreen® (1:200 TE) foi adicionado aos poços e deixado em repouso, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Então, a fluorescência foi lida nos comprimentos de onda de 480nm de excitação e 520nm de emissão. Foi calculada a média da triplicata para submeter à análise estatística.

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram tabulados e analisados conforme média e desvio padrão usando os programas estatísticos: Minitab (versão 17, Inc. State College, Pennsylvania, U.S.A.), GMC Basic Software (versão 7.7, Prof. Dr. Geraldo Maia Campos – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil) e Statistical Package for Social Sciences (SPSS),

(versão 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados dos testes TBARS 72h e Ensaio Cometa foram avaliados através do teste Anova seguido do teste post hoc de Dunnett, enquanto os dados dos demais testes foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **Resultados**

### **Citotoxicidade**

#### **Viabilidade Celular - Ensaio MTT**

Na exposição de CMSP às soluções irrigadoras e às associações farmacológicas, em 24h, foi observada diminuição da viabilidade celular em todos os grupos testados, comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Em 72h, os grupos mantiveram a diminuição, exceto os G5, G7 e G9 ( $p < 0,05$ ). O G11 apresentou viabilidade celular semelhante ao CN em 72h ( $p > 0,05$ ) (Figura 1).

#### **Peroxidação Lipídica - Ensaio TBARS**

Os G5 e G9 aumentaram os níveis de peroxidação lipídica, em 24h, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Já em 72h, foram observados índices elevados de peroxidação lipídica, nos G1, G2, G6, G8 e G10 ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

### **Genotoxicidade**

#### **Dano ao DNA - Ensaio Cometa**

Os resultados demonstraram que todos os grupos, soluções irrigantes e associações farmacológicas, promoveram quebra no DNA das CMSP quando comparados ao grupo controle, em 24h e 72h ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).

#### **Dano ao dsDNA- Teste GEMO**

Os grupos G1 ao G10, causaram dano ao dsDNA comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

## Discussão

As soluções irrigantes empregadas no tratamento endodôntico podem entrar em contato com os tecidos periapicais, havendo a possibilidade de gerar efeitos adversos, como toxicidade e atraso no processo de reparo, sendo fundamental a avaliação da biocompatibilidade das mesmas (Bartelstone 1951, Chang *et al.* 2001, Nishimura *et al.* 2008). Essa condição aplica-se, especialmente nos dentes decíduos, onde a determinação de um ápice anatômico fica dificultada pela característica rizólize em bisel das raízes desses dentes (Camp, 2008). Não há uma substância que, única, reúna todas as propriedades exigidas para uma solução, impondo a necessidade do emprego de associações farmacológicas.

Aliado a esse raciocínio, este estudo avaliou, *in vitro*, a citotoxicidade (viabilidade celular e peroxidação lipídica) e a genotoxicidade de soluções irrigantes e associações farmacológicas utilizadas na pulpectomia de dentes decíduos. Até o presente momento, não existem pesquisas que tenham avaliado a toxicidade de associações de soluções irrigantes principais e auxiliares, como foi realizado neste trabalho.

O Ensaio MTT, fornece resultados de citotoxicidade não somente de viabilidade celular em uma amostra, mas também do nível de sua atividade metabólica, pois o teste baseia-se na atividade mitocondrial de células viáveis (Ciapetti *et al.* 1993, Chan *et al.* 1999). Através da Peroxidação Lipídica observa-se o dano à membrana celular em decorrência do estresse oxidativo (produção exacerbada de espécies reativas ao oxigênio - ERO) apesar de ERO serem observadas em diversas condições fisiológicas, sendo parte integrante do metabolismo humano, há fortes evidências da relação de produção exacerbada de ERO com processos como indução de câncer e morte celular (Vasconcelos *et al.* 2007). O Ensaio Cometa é um método padrão para avaliação de dano ao DNA, de execução simples e alta sensibilidade, possibilita avaliar o potencial genotóxico ao quantificar os níveis de quebras de fitas simples de DNA (García *et al.* 2004). O Teste GEMO também permite a análise da potencial capacidade mutagênica de um produto, mas sem interferência de variáveis metabólicas celulares e fisiológicas. É um teste ultrassensível, simples, rápido e preciso (Cadoná, 2013). Utilizando uma variedade de métodos, que avaliam a toxicidade em parâmetros diferentes nas células, obtem-se informações mais completas (Tang *et al.* 1999).

As CMSP foram escolhidas por serem tipos celulares presentes na região periapical, local que estabelece íntimo contato com as soluções avaliadas neste estudo (Bartelstone 1951), além disso, linfócitos do sangue periférico tem sido aplicados, há décadas, em ensaios de citotoxicidade (Ciapetti *et al.* 1993) e de genotoxicidade, como biomarcadores dos primeiros efeitos genotóxicos (Maluf & Riegel 2011).

Apesar de alguns estudos analisarem os produtos em várias diluições, nesta pesquisa optou-se em avaliar as soluções nas concentrações empregadas na prática clínica, pois é muito difícil, se não impossível, determinar a quantidade e concentração destes produtos que chegam à região periapical (Lee *et al.* 2010).

Foi encontrada redução na viabilidade celular nos dois tempos avaliados no MTT com as soluções irrigantes principais, NaOCl (1% e 2,5%) e CHX 2%. Esses resultados estão de acordo com ensaios anteriores, como Heling *et al.* (2001), que encontraram citotoxicidade para o NaOCl acima de 0,01%, avaliando a sobrevivência celular em fibroblastos (de pele humana). Também, Barnhart *et al.* (2005), pelo ensaio CyQuant® (viabilidade celular), analisaram fibroblastos (de gengiva humana) expostos ao NaOCl 5,25% em várias diluições, e constataram redução de 50% na viabilidade celular a 0,04%. Navarro-Escobar *et al.* (2010) avaliaram viabilidade celular do NaOCl 2,5%, em duas diluições, 0,1% e 0,5%, com o teste MTT 24h, em fibroblastos (NIH/3T3), e também encontraram redução significativa em 0,5%, apenas a diluição de 0,1%, demonstrou níveis mais altos de viabilidade celular. Marins *et al.* (2012) avaliaram viabilidade celular pelo teste azul de tripan em fibroblastos de murino do NaOCl (1,25%, 2,5% e 5,25%) e observaram citotoxicidade significativa, exceto para 1,25%, associamos esse resultado ao tempo de exposição de 3h, enquanto neste trabalho o NaOCl 1% reduziu viabilidade celular em tempos de exposição de 24 e 72h.

Quanto à CHX, Chang *et al.* (2001), através de uma variedade de testes, incluindo o MTT, compararam a toxicidade das duas soluções (NaOCl 5,25% e CHX 5%) em várias diluições, em células do ligamento periodontal humano e observaram que a CHX foi mais citotóxica, mesmo em concentrações mais baixas que as testadas no presente estudo, corroborando com as observações encontradas, em que a CHX reduziu a viabilidade celular, em índices maiores que os do NaOCl em 72h no MTT. Lee *et al.* (2010), também observaram inibição de crescimento celular em osteoblastos humanos, sugerindo que efeitos prejudiciais da CHX, inclusive em

concentrações mais baixas, podem prejudicar o processo de reparo e regeneração dos tecidos periapicais, ressaltando o potencial de toxicidade significativo desse irrigante nessa região. Em adição a isso, Lessa *et al.* (2010), encontraram citotoxicidade da CHX 2%, com diminuição da viabilidade celular no ensaio MTT em odontoblastos (MDPC-23), concordando com os achados desta pesquisa.

Já no teste TBARS, a CHX não demonstrou ser tóxica às células, pois não foi observada lipoperoxidação em nenhum dos tempos avaliados, assim sugere-se que a citotoxicidade dessa solução pode estar relacionada à alteração no metabolismo celular (dano à mitocôndria), observada pela diminuição na viabilidade celular no MTT. Ao contrário, o NaOCl (1% e 2,5%) causou peroxidação lipídica, em 72h, indicando que ao passar do tempo o contato com as células pode causar estresse oxidativo. Saghiri *et al.* (2011), já sugeriram que o elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática e está relacionado com a destruição dos fosfolipídios da membrana. Analisando esses resultados pode-se sugerir que o NaOCl em ambas as concentrações apresenta maior potencial de toxicidade às CMSP do que a CHX.

Neste ensaio, as duas soluções principais demonstraram potencial genotóxico nos dois testes realizados (GEMO e Cometa). Vale lembrar a escassez de estudos de genotoxicidade sobre a CHX como agente antimicrobiano endodôntico, sendo mais investigados os efeitos adversos dessa solução para uso tópico. Ribeiro *et al.* (2005) testaram, através do Ensaio Cometa, com células de ovário de hamster, a genotoxicidade da CHX em diversas concentrações (entre 0,1% a 1%) e não encontraram dano ao DNA, contrastando com os resultados desta pesquisa, onde essa solução apresentou potencial genotóxico. Sugere-se que a diferença entre os resultados pode estar relacionada às concentrações das soluções testadas, diferentes deste ensaio. Marins *et al.* (2012) não encontraram dano ao DNA com o NaOCl (1,25%, 2,5% e 5%) no Ensaio Cometa, porém o tempo de exposição foi de 3h.

Na avaliação das soluções irrigantes auxiliares o EDTA 17% causou redução na viabilidade celular em 24h, que não se manteve em 72h bem como lipoperoxidação em 24h, que não se manteve em 72h.

Koulaouzidou *et al.* (1999) observaram citotoxicidade severa do EDTA 17%, com redução significativa na viabilidade celular, em células L929 (fibroblastos), com o teste azul de tripan, em 24h. Os achados desta pesquisa também atestaram uma

redução significativa de viabilidade celular, em 24h, entretanto não se manteve em 72h, essa recuperação na viabilidade da cultura celular também foi verificada por Saghiri *et al.* (2011), que avaliaram a viabilidade celular de fibroblastos (gengiva humana) expostos ao EDTA 17%, através do MTT, em 1, 6 e 12h. Apesar dos tempos testados serem diferentes, esses autores constataram uma redução na viabilidade nas primeiras horas (6h), seguido de aumento na fluorescência nas culturas após este tempo (12h), observando resultados de menor citotoxicidade com o passar do tempo, e associaram esse achado a fatores relacionados à reserva nutricional, capacidade de dispersão de substâncias no meio ambiente e a adaptação das células para o ambiente.

Quanto ao AC 6%, esta pesquisa constatou uma diminuição da viabilidade celular nos dois tempos avaliados, que pode estar relacionada à alteração do pH do meio da cultura exposto à solução de pH ácido, como sugeriram Chan *et al.* (1999), que também observaram forte citotoxicidade desta solução com o MTT e relataram elevados índices de morte celular (células da polpa dentária humana) a partir de 0,5%. Navarro-Escobar *et al.* (2010) também encontraram redução da viabilidade celular avaliando o AC 15% com o MTT (24h) com fibroblastos (3T3L1) expostos à solução diluída em 0,1% e 0,5%. Guimarães *et al.* (2010) avaliaram viabilidade celular (azul de tripan) em osteoblastos humanos tratados com AC 4%, 6%, 8% e 10%, e observaram que o AC 4% restaurou taxas de viabilidade aproximadas as do controle após três dias, mas encontraram citotoxicidade nas concentrações mais altas constatando redução significativa de células viáveis acima de 6%, concordando com os resultados deste estudo.

Apesar das duas soluções terem apresentado efeitos tóxicos às CMSP, pode-se sugerir menor potencial citotóxico do EDTA observando que em 72h a cultura apresentou índices elevados de viabilidade celular.

Nos Ensaio Cometa (24h e 72h) e GEMO, as duas soluções demonstraram potencialidades genotóxicas, causando quebras ao DNA. Contrastando com os resultados de Marins *et al.* (2012) que avaliaram a genotoxicidade pelo Ensaio Cometa, com fibroblastos de murino expostos por 3h ao EDTA 17% e ao AC (10,5% e 21%) e não foi observado danos ao DNA em nenhuma das concentrações dessas soluções. Acredita-se que a divergência entre esses resultados e os desta pesquisa ocorreu pela diferença do tempo de exposição das células às soluções testadas.

Neste trabalho, foi avaliada a toxicidade de associações farmacológicas, pois já é reconhecida a superioridade na sanificação do sistema de canais com o uso de uma solução antimicrobiana seguida de uma solução quelante, para remoção da SL (Barcelos *et al.* 2012). Apesar dessas soluções não estarem misturadas durante o uso, a infiltração nos túbulos dentinários e no caso de difusão aos tecidos periapicais, ocasionará interação entre elas (Rasimick *et al.* 2008).

Na análise das associações do NaOCl com as soluções auxiliares, apesar de todas terem gerado quebra de DNA em todos os ensaios de genotoxicidade realizados, a análise dos testes de viabilidade celular e estresse oxidativo permitiu observar que o NaOCl associado ao AC apresentou maior potencial de toxicidade do que o NaOCl com o EDTA.

Enquanto as associações do NaOCl (1% e 2,5%) com EDTA apresentaram redução de viabilidade celular em 24h, que não se manteve em 72h, e a lipoperoxidação ocorreu somente na maior concentração do NaOCl (2,5%), em 24h, e também não se manteve em 72h, as associações do NaOCl (1% e 2,5%) com o AC apresentaram redução da viabilidade celular nos dois tempos avaliados e peroxidação lipídica em 72h, demonstrando dano com tempo maior de exposição.

Esses resultados podem estar relacionados a um subproduto das reações dessas associações, o gás cloro, que tem efeito potencialmente nocivo aos seres humanos e é liberado com a redução dos valores do pH do NaOCl ao associá-lo a soluções quelantes (Baumgartner & Ibay, 1987). Baumgartner & Ibay (1987) avaliaram a formação de gás cloro nas associações NaOCl (5,25%) com EDTA (15%) e AC (50%) e verificaram que a formação de gás cloro foi mais detectável, e presente numa maior distância, na interação NaOCl (pH=12,12) com AC (pH=1,28), do que na associação NaOCl com EDTA (pH=7,51), relatando que o pH mais baixo do AC favoreceu a energia inicial de reação. Também Prado *et al.* (2013) avaliaram a combinação NaOCl (2,5%) com EDTA (17%) e com AC (10%) e notaram a formação de bolhas, sendo elas essencialmente gás de cloro e mais intensas com o AC.

Na associação da CHX com as soluções auxiliares, a interação com o AC também demonstrou mais toxicidade do que com o EDTA, neste trabalho. Enquanto observou-se redução da viabilidade celular em 24h e 72h, peroxidação lipídica em 72h e dano ao DNA nos dois ensaios realizados, na interação da CHX com AC, a associação da CHX com EDTA demonstrou o menor potencial tóxico de todas as

associações farmacológicas. Apesar de causar quebra de DNA no Ensaio Cometa e reduzir a viabilidade celular em 24h, conseguiu recuperar a viabilidade celular em 72h com índices semelhantes ao controle negativo, não causou estresse oxidativo, nem foi genotóxica no teste GEMO.

Há escassos ensaios avaliando a interação entre essas soluções, sabe-se que na associação da CHX 2% com AC 10% nenhum subproduto foi observado e na CHX 2% com EDTA 17% notaram um precipitado químico branco leitoso, provavelmente associado a uma reação ácido base (Prado *et al.* 2013). Essa provável reação de neutralização eletrostática da CHX (catiônica) pelo EDTA (aniônico) lembrada por Rasimick *et al.* (2008), poderia estar relacionada aos achados menos tóxicos dessa associação neste ensaio. Enquanto a ausência de precipitado na interação da CHX com o AC (Prado *et al.* 2013), poderia ser sugerida como uma ausência de reação entre as soluções, onde elas preservariam suas propriedades e efeitos tóxicos originais, mas salienta-se a necessidade de mais testes para inferir esses pressupostos.

Testes *in vitro* são úteis para compreender os efeitos biológicos básicos dos materiais dentários, mas são limitados na capacidade de simular as condições clínicas, podendo ser pouco realista transferir os resultados *in vitro* para a situação *in vivo*. No corpo humano, estes efeitos cito e genotóxicos podem ser diferentes, pois há o processo de reparo celular. No entanto, dados da avaliação da toxicidade *in vitro* geram informações valiosas sobre o potencial de toxicidade geral dos materiais testados (Koulaouzidou *et al.* 1999; Malheiros *et al.* 2005). Uma sequência de testes padronizados para dar continuidade a avaliação da biocompatibilidade dessas soluções e associações empregadas na pulpectomia de dentes decíduos são sugeridos pela *International Standard Organization ISO-10993*.

## **Conclusão**

Todas as soluções irrigantes e associações farmacológicas testadas demonstraram algum nível de cito e genotoxicidade. Entretanto, ao comparar os resultados obtidos, observou-se que entre as soluções principais a CHX apresentou menor potencial de citotoxicidade, e entre as soluções auxiliares o EDTA foi o

menos citotóxico às CMSP. Analisando as associações farmacológicas, a interação da CHX com o EDTA demonstrou o menor potencial de toxicidade entre os grupos avaliados, pois apresentou níveis de recuperação da viabilidade celular em 72h, e também não causou dano ao dsDNA no teste GEMO. A partir dos resultados obtidos, ficou demonstrada a melhor biocompatibilidade, *in vitro*, da associação de CHX com EDTA.

## Referências

- Ahmed HMA (2013) Anatomical challenges, electronic working length determination and current developments in root canal preparation of primary molar teeth. *International Endodontic Journal* **46**, 1011-1022.
- Barcelos R, Tannure PN, Gleiser R, Luiz RR, Primo LG (2012) The influence of smear layer removal on primary tooth pulpectomy outcome: a 24-month, double-blind, randomized, and controlled clinical trial evaluation. *International Journal of Paediatric Dentistry* **22**, 369-381.
- Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP (2005) An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *Journal of Endodontics* **31**, 613-615.
- Bartelstone HJ (1951) Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *Journal of Dental Research* **30**, 728-733.
- Baumgartner JC, Ibay AC (1987) The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *Journal of Endodontics* **13**, 47-51.
- Bulacio ML, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G (2006) *In vitro* antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontológica Latino americana* **19**, 75-80.
- Cadoná FC (2013) Desenvolvimento de um método de análise *in vitro* da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos (Dissertação de Mestrado). Santa Maria, RS, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria.
- Camp JH (2008) Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. *Journal of Endodontics* **34**, 6-12.
- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN et al. (2010) Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental Materials* **26**, 779-85.

Chan CP, Jeng JH, Hsieh CC, Lin CL, Lei D, Chang MC (1999) Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* **25**, 354-358.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY (2001) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **92**, 446-450.

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

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.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K (2004) Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *Journal of Endodontics* **30**, 84-87.

García O, Mandina T, Lamadrid AI *et al.* (2004) Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research* **22**, 25-34.

Guimarães LF, Fidalgo TK, Menezes GC, Primo LG, Costa e Silva-Filho F (2010) Effects of citric acid on cultured human osteoblastic cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **110**, 665-669.

Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D (2001) Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. *Journal of Endodontics* **27**, 278-280.

International Standard Organization ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices– Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity. Geneva International Organization for Standardization, 2009.

Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH (1999) Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *Journal of Endodontics* **25**, 21-23.

Kumar VD (2009) A scanning electron microscope study of prevalence of accessory canals on the pulpal floor of deciduous molars. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* **27**, 85-89.

Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC (2010) Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *International Endodontic Journal* **43**, 430-435.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA (2010) Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *Journal of Applied Oral Science* **18**, 50-58.

- Malheiros CF, Marques MM, Gavini G (2005) *In vitro* evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *Journal of Endodontics* **31**, 746-748.
- Maluf SW, Riegel M (2011) *Citogenética Humana*. 1ª ed pp. 194-202. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed.
- Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA (2012) *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Brazilian Dental Journal* **23**, 527-533.
- Montagner GFS, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, Da Cruz IB. et al. (2010) Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology In Vitro* **24**, 1410-1416.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.
- Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM (2010) Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **15**, 90-94.
- Nishimura H, Higo Y, Ohno M, Tsutsui TW, Tsutsui T (2008) Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromosome aberrations in human dental pulp cells. *Mutation Research* **649**, 45-53.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.
- Peres CM, Curi R (2005) *Como cultivar células*. 1ª ed Rio de Janeiro,RJ, Brasil: Guanabara Koogan.
- Peters OA (2013) Editorial. *International Endodontic Journal* **46**, 195–197.
- Pitoni CM, Figueiredo MC, Araújo FB, Souza MA (2011) Ethylenediaminetetraacetic acid and citric acid solutions for smear layer removal in primary tooth root canals. *Journal of Dentistry for Children (Chic)* **78**, 131-137.
- Poornima P, Subba Reddy VV (2008) Comparison of digital radiography, decalcification, and histologic sectioning in the detection of accessory canals in furcation areas of human primary molars. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* **26**, 49-52.
- Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM et al. (2013) Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *Journal of Endodontics* **39**, 505-510.

Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS (2008) Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *Journal of Endodontics* **34**, 1521-1523.

Ribeiro DA, Scolastici C, De Lima PL, Marques ME, Salvadori DM (2005) Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **99**, 637-640.

Ribeiro DA (2008) Single-cell gel (comet) assay as a promising tool for the detection of DNA damage induced by compounds used in dental practice: the oral cancer risk assessment. *Critical reviews in oncogenesis* **14**, 165-75.

Rodd HD, Waterhouse PJ, Fuks AB, Fayle SA, Moffat MA (2006) Pulp therapy for primary molars. *International Journal of Paediatric Dentistry* **16**, 15-23.

Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P *et al.* (2011) The impact of pH on cytotoxic effects of three root canal irrigants. *The Saudi Dental Journal* **23**, 149-152.

Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr (2008) Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Australian Endodontic Journal* **34**, 19-24.

Shahravan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahimi H, Shadifar F (2007) Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endodontics* **33**, 96-105.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184-191.

Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y (1999) Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *Journal of biomedical materials research* **45**, 214-222.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* **30**, 1323-1338.

Wang YL, Chang HH, Kuo CI *et al.* (2013) A study on the root canal morphology of primary molars by high-resolution computed tomography. *Journal of Dental Sciences* **8**, 321-327.

## FIGURAS

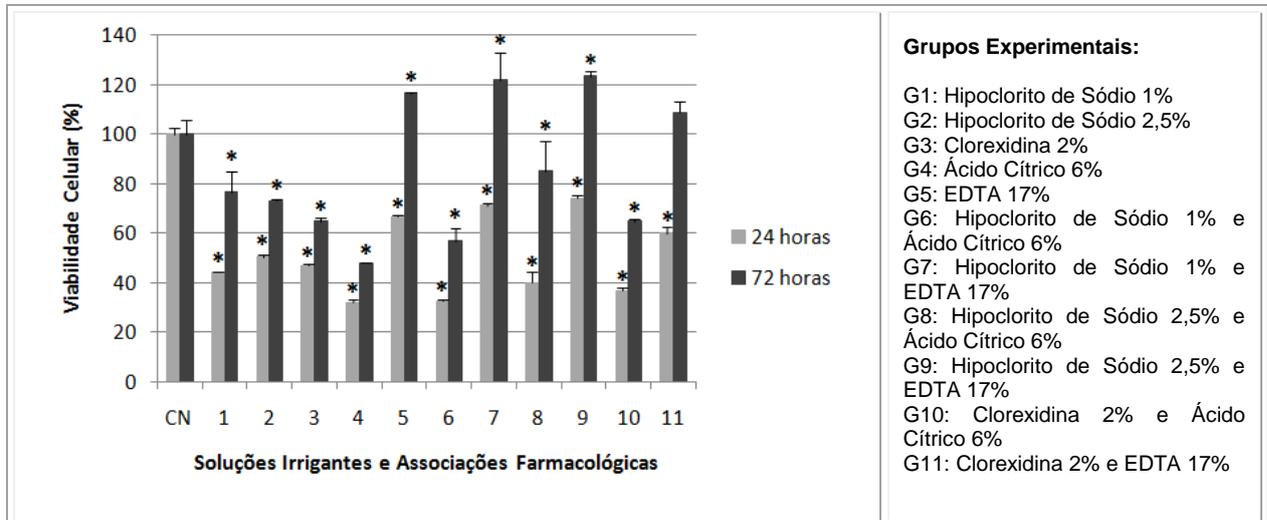


Figura 1 - Resultados do Teste MTT, em 24h e 72h. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle negativo (CN).

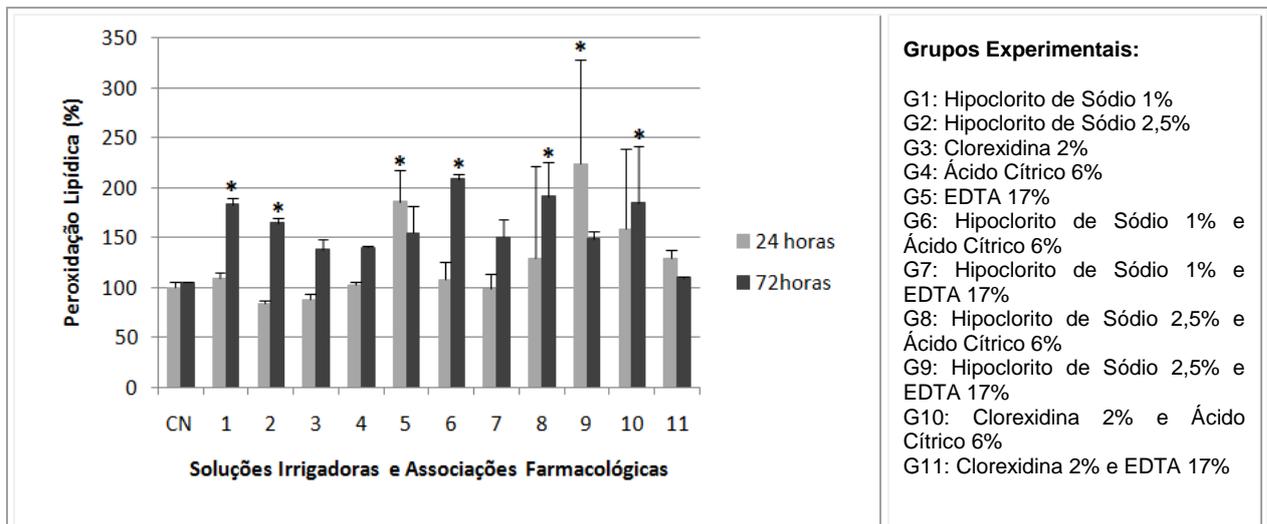


Figura 2 - Resultados do Teste TBARS, em 24h e 72h. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle negativo (CN).

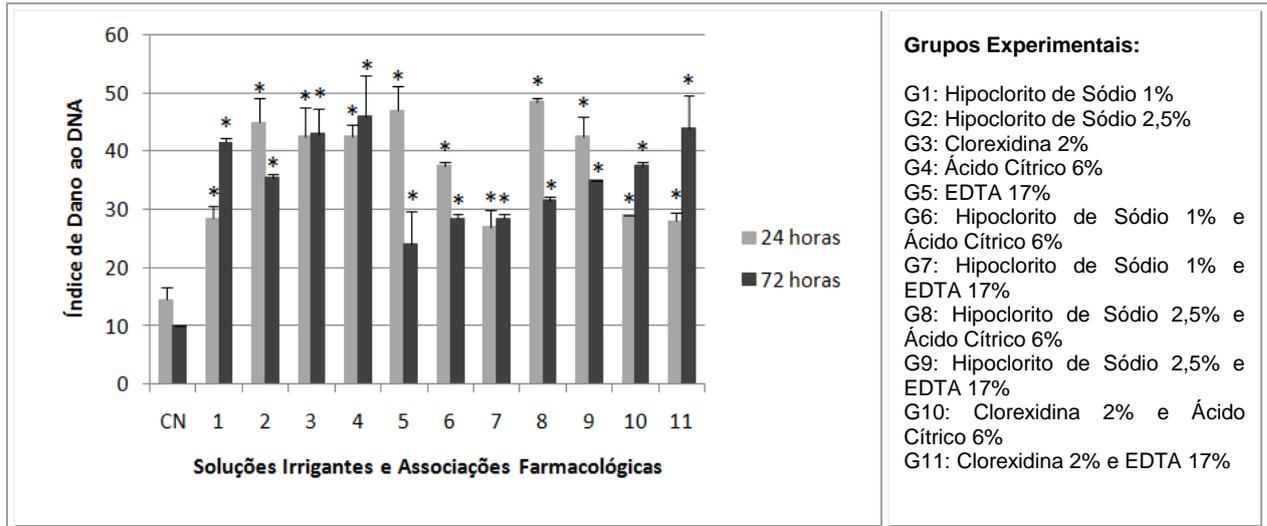


Figura 3 - Resultados do Ensaio Cometa, em 24h e 72h. Dados do índice de dano expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle negativo (CN).

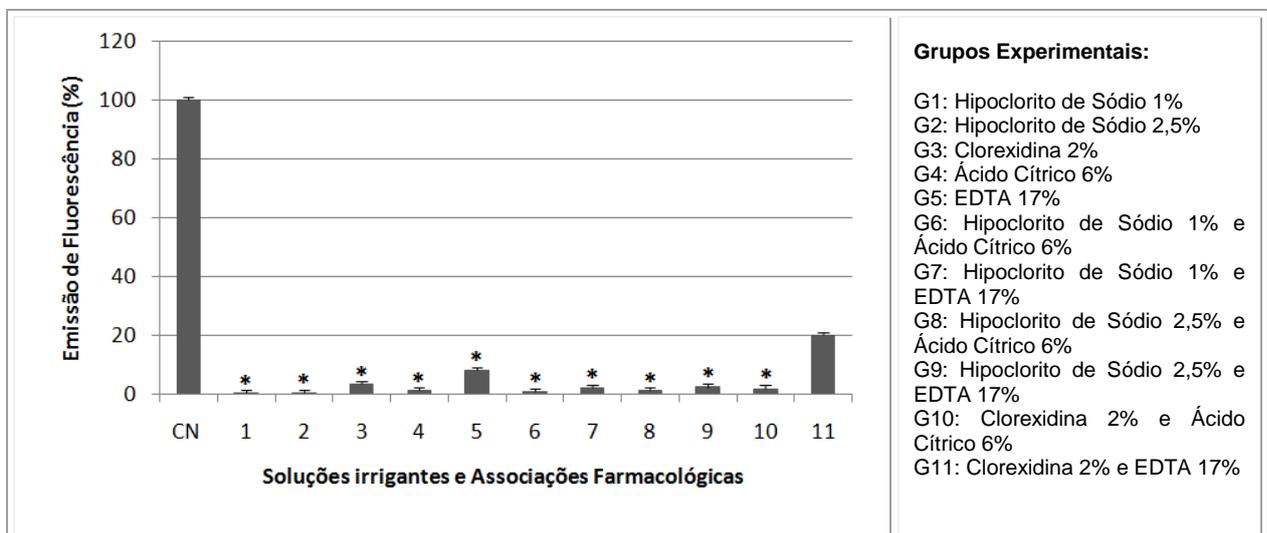


Figura 4 – Resultados do Teste GEMO. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle negativo (CN).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade de soluções irrigantes e associações farmacológicas empregadas na pulpectomia de dentes decíduos.

Apesar de estudos anteriores já terem testado a toxicidade dessas soluções, não encontramos ensaios que tenham avaliado cito e genotoxicidade das soluções associadas. Assim, este estudo foi o primeiro que buscou esses resultados realizando uma variedade de testes, *in vitro*, que avaliaram a toxicidade através de parâmetros diferentes, a fim de obter informações mais completas.

Mesmo que testes *in vitro* apresentem limitações ao tentarmos transferir seus resultados para situações *in vivo*, devido ao processo de reparo celular que há no corpo humano, nos fornecem informações valiosas sobre o potencial de toxicidade de um produto, sendo úteis na compreensão dos efeitos biológicos básicos de materiais dentários. Ainda, são os primeiros passos para viabilizar a sequência de estudos que confirmem a possibilidade de uso clínico dessas soluções e associações.

Assim, estes resultados são importantes, pois demonstraram um menor potencial de toxicidade da interação entre a CHX e o EDTA, uma combinação com eficácia comprovada na sanificação do sistema de canais radiculares, sugerindo-se seguir uma sequência de estudos para embasar seu uso clínico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H.M.A. Anatomical challenges, electronic working length determination and current developments in root canal preparation of primary molar teeth. **International Endodontic Journal**, v.46, n.11, p.1011-1022. 2013.

AUBUT, V. et al. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.109, n.2, p.120-125.2010.

BARCELOS, R. et al. The influence of smear layer removal on primary tooth pulpectomy outcome: a 24-month, double-blind, randomized, and controlled clinical trial evaluation. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 22, n.5, p. 369-381. 2012.

BARNHART, B.D. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v.31, n.8, p.613-615. 2005.

BARTELSTONE, H.J. Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *Journal of Dental Research*, v.30, n.5, p.728-733.1951.

BAUMGARTNER, J.C.; IBAY, A.C. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. **Journal of Endodontics**,v.13, n.2, p.47-51. 1987.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO P.D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do Ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344. 2006.

BULACIO, M.L. et al. *In vitro* antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v.19, n.2, p.75-80. 2006.

CADONÁ, F.C. **Desenvolvimento de um método de análise *in vitro* da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

CAMP, J.H. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. **Journal of Endodontics**, v.34, n.7, p.6-12. 2008.

CARRILHO M.R. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dental Materials**, v.26, n.8, p.779-785. 2010.

CHAN, C.P. et al. Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v.25, n.5, p.354-358. 1999.

CHANG, Y.C. et al. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.92, n.4, p.446-450.2001.

CIAPETTI, G. et al. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v.14, n.5, p.359-354. 1983.

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 Methods**, v.89, n.2, p.271-277. 1986.

ERCAN E. et al. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. **Journal of Endodontics**, v.30, n.2, p.84-87.2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, n.6809, p.239-247. 2000.

GARCÍA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research**, v.556, n.1-2, p.25-34. 2004.

GUIMARÃES, L.F. Effects of citric acid on cultured human osteoblastic cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.110, n.5, p.665-669. 2010.

GÜL, S.; SAVSAR, A.; TAYFA, Z. Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes *in vitro*. **Cytotechnology**, v.59, n.2, p.113-119. 2009.

HARIHARAN, V.S.; NANDLAL, B.; SRILANTHA, K.T. Efficacy of various root canal irrigants on removal of smear layer in the primary root canals after hand instrumentation: a scanning electron microscopy study. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.28, n.4, p.271-277. 2010.

HELING I. et al. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. **Journal of Endodontics**, v.27, n.4, p.278-280.2001.

International Standard Organization ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices– Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity. Geneva International Organization for Standardization, 2009.

KOULAOUZIDOU, E.A. et al. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v.25, n.1, p.21-23. 1999.

KUMAR, V.D. A scanning electron microscope study of prevalence of accessory canals on the pulpal floor of deciduous molars. **Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.27, n.2, p.85-89.2009.

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.430-435. 2010.

LESSA F.C. et al. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. **Journal of Applied Oral Science**, v.18, n.1, p.50-58. 2010.

MALHEIROS, C.F.; MARQUES, M.M.; GAVINI, G. *In vitro* evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v.31, n.10, p.746-748. 2005.

MALUF, S.W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MARINS, J.S. et al. *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. **Brazilian Dental Journal**, v.23, n.5, p.527-533. 2012.

MONTAGNER G.F.S.; SAGRILLO M.; MACHADO M.M. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**, v.24, n.5, p.1410-1416. 2010.

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

NAVARRO-ESCOBAR, E.; RODRÍGUEZ, M.P.G.; LUQUE, C.M.F. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.15, n.1, p.90-94. 2010.

NISHIMURA, H. et al. Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromosome aberrations in human dental pulp cells. **Mutation Research**, v.649, n.1-2, p.45-53. 2008.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1ª ed Rio de Janeiro,RJ, Brasil: Guanabara Koogan, 2005.

PETERS O.A. Editorial. **International Endodontic Journal**, v.46, p.195–197. 2013.

PITONI C.M.; FIGUEIREDO M.C.; ARAÚJO F.B.; SOUZA M.A. Ethylenediaminetetraacetic acid and citric acid solutions for smear layer removal in primary tooth root canals. **Journal of Dentistry for Children**, v.78, n.3, p.131-137. 2011.

POORNIMA P.; SUBBA REDDY V.V. Comparison of digital radiography, decalcification, and histologic sectioning in the detection of accessory canals in furcation areas of human primary molars. **Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.26, n.2, p.49-52. 2008.

PRADO M. et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.505-510. 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358. 1979.

RASIMICK, B.J. et al. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. **Journal of Endodontics**, v.34, n.12, p.1521-1523. 2008.

RIBEIRO, D.A. et al. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **Journal of Periodontal Research**, v.39, n.5, p.358-361. 2004.

RIBEIRO, D.A. et al. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.99, n.5, p.637-640. 2005.

RIBEIRO D.A. Single-cell gel (comet) assay as a promising tool for the detection of DNA damage induced by compounds used in dental practice: the oral cancer risk assessment. **Critical reviews in oncogenesis**, v.14, n.2-3, p.165-175. 2008.

RODD, H.D. et al. Pulp therapy for primary molars. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.16, Suppl.1, p.15-23. 2006.

SAGHIRI, M.A. et al. The impact of pH on cytotoxic effects of three root canal irrigants. **The Saudi Dental Journal**, v.23, n.3, p.149-152. 2011.

SASSONE L.M. et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. **Australian Endodontic Journal**, v.34, n.1, p.19-24. 2008.

SHAHRAVAN A. et al. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v.33, n.2, p.96-105. 2007.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191. 1988.

SIQUEIRA J.F.JR. et al. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.104, n.1, p.122-130. 2007.

TANG A.T.; LI J.; EKSTRAND J.; LIU Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a

testing device. **Journal of biomedical materials research**. v.45, n.3, p.214-222. 1999.

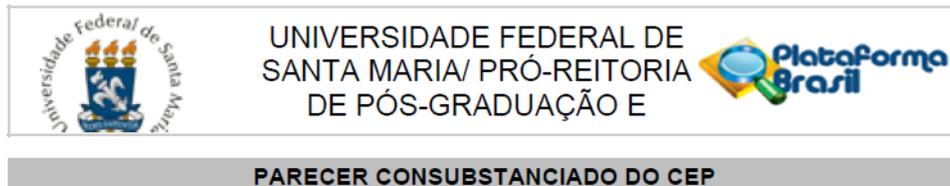
VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338. 2007.

WANG, Y.L. et al. A study on the root canal morphology of primary molars by high-resolution computed tomography. **Journal of Dental Science**, v.8, n.3, p.321–327. 2013.

WATAHA, J.C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.86, n.2, p.203-209. 2001.

## ANEXOS

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



#### 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.

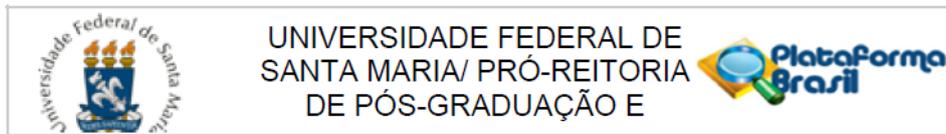
#### Objetivo da Pesquisa:

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.

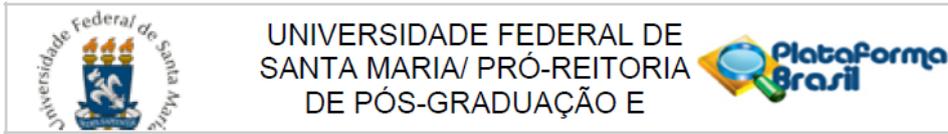
**Situação do Parecer:**

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 Endodontics 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](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 preference 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](http://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 Declaration of Helsinki (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.