

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

**INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE, ESTRESSE  
OXIDATIVO E GENOTOXICIDADE POR PASTAS  
OBTURADORAS PARA DENTES DECÍDUOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carine Weber Pires**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E  
GENOTOXICIDADE POR PASTAS OBTURADORAS PARA  
DENTES DECÍDUOS**

**Carine Weber Pires**

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. 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).

Weber Pires, Carine

Indução de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade por pastas obturadoras para dentes decíduos / Carine Weber Pires.-2014.

57 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. materiais de pulpectomia e capeamento pulpar 2. dente decíduo 3. teste de biocompatibilidade 4. obturação do canal radicular 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

**INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E  
GENOTOXICIDADE POR PASTAS OBTURADORAS PARA  
DENTES DECÍDUOS**

elaborada por  
**Carine Weber Pires**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

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

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

Santa Maria, 05 de agosto de 2014

Dedico este trabalho à minha família. Meus pais, **Dario** e **Bernadete**, pelo amor e apoio incondicionais, pelo exemplo de caráter, pela família que construíram para nós, da qual eu me orgulho muito, e por investirem sempre na minha educação, sendo esse o maior presente que poderiam me dar. Minhas irmãs, **Mills** e **Carol**, meus exemplos desde pequeninha, que são minhas amigas e companheiras, em fases boas ou ruins, para toda a vida.

## Agradecimentos

À **coordenação e professores** do Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Santa Maria, por contribuírem muito para a minha formação pessoal e profissional. Em especial à secretária, Jéssica, pela ajuda em todos os momentos em que precisei de algo, mas também pelas conversas, apoio e amizade. Também, à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para apoiar e incentivar meus estudos.

Aos professores da Odontopediatria. Em especial, às professoras e amigas, **Marta D. M. Oliveira** e **Rachel O. Rocha**, que eu admiro muito, como pessoas e profissionais, e com as quais eu aprendo muito todos os dias. Obrigada pela paciência, carinho, atenção, risadas, apoio, e principalmente pelo exemplo que são pra mim, pois a cada dia que passa me ajudam a reforçar meu amor pela Odontopediatria. Prof. **Leandro B. Osório** e **Ana Paula Mainardi** pela convivência na clínica, apoio e ensinamentos. Prof. **Thiago M. Ardenghi**, pelos ensinamentos, exemplo de profissional e pessoa, e por me ajudar a finalmente entender e gostar de estatística, depois que cursei a disciplina de Epidemiologia. Agradecer também ao Prof. **Luciano Casagrande** e à doutoranda **Stefanie Werle** pela atenção, disponibilidade e pelas grandes contribuições nesse trabalho.

À minha orientadora, dentista, e amiga, Prof. **Juliana R. Praetzel**, que me orientou e acolheu, confiando na minha capacidade e contribuindo muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço muito por todo o tempo e atenção que dedicou a mim e à minha formação, assim como pela amizade e carinho que tens por mim, o que é recíproco.

Às funcionárias, **Vera loira, Vera morena, Dalva** e **Sandrinha**, da Odontopediatria, pelo carinho e abraço acolhedor, palavras doces e convivência muito divertida.

À Prof. **Michele Sagrillo, Alencar Machado, Francine Cadoná, Verônica Azzolin** e **Fernanda Barbisan**, pelo grande apoio durante o planejamento e execução deste trabalho.

Aos colegas com os quais eu convivi, em especial **Sara Fraga, Carmela Bresolin, Patrícia Henke, Fernanda Tomazoni, Bruna Antoniazzi, Bruno Emmanuelli, Flávia Vieira, Yassmin Ramadan, Bernardo Agostini, Brenda Nakashima, Gabriel Nicoloso, Janessa Engelman, Catina Prochnow, Laís Bee, Cristiane Arend** e **Katia Garlet**. Obrigada pela amizade, convivência agradável e divertida na clínica, pelo apoio, motivação, jantinhas, festas e risadas. Às queridas **Iana Lamadrid** e **Kaline Thume**, pelos cafés, carinho e amizade.

À minha dupla dinâmica, **Graziela Botton**, que eu tive a sorte de conhecer durante o mestrado e que se tornou uma grande amiga. A ela dedico essa frase, que foi o que nos fez ser perseverantes diante de qualquer adversidade: “É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas” (Antoine de Saint-Exupéry).

Aos amigos queridos, com os quais não convivo diariamente, mas que estão sempre me apoiando e me fazendo bem, mesmo de longe: **Bernardo, Dionéia, João, Camila, Letícia, Bruna, Vivian, Andréa, Fernando, Tieli** e **Fofoletes** (Japa, Debs, Ana, Bi, Deise e Manu).

À **Deus**, que me ilumina e traz paz quando mais preciso, abençoa os meus dias, me rodeando de pessoas boas e me dá saúde pra seguir em frente e correr atrás dos meus objetivos.

“Foi o tempo que dedicastes à  
tua rosa que fez tua rosa tão  
importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

## RESUMO

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

### INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E GENOTOXICIDADE POR PASTAS OBTURADORAS PARA DENTES DECÍDUOS

AUTORA: CARINE WEBER PIRES  
ORIENTADORA: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de agosto de 2014.

A terapia pulpar em dentes decíduos requer como complemento ao preparo químico-mecânico, pastas obturadoras capazes de manter o poder antimicrobiano, ajudando na sanificação do canal radicular. Por estabelecerem íntimo contato com os tecidos dentários, é imprescindível a realização de testes de biocompatibilidade que atestem a segurança desses produtos para aplicação clínica. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de quatro pastas iodoformadas, três pastas de hidróxido de cálcio, e seus principais componentes, em causar citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro*. Células mononucleares de sangue periférico e DNA purificado de timo de bezerro (teste GEMO) foram expostos a extratos desses produtos. O ensaio MTT avaliou a citotoxicidade. A geração de espécies reativas de oxigênio foi avaliada pelo teste DCFH-DA, e a peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS. A genotoxicidade foi avaliada pelo Ensaio Cometa Alcalino e GEMO. Todos os testes foram realizados em 24 e 72 horas, exceto o GEMO. Após teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os resultados foram analisados por Kruskal-Wallis e Dunn, ANOVA e Dunnett, com  $p < 0,05$ . No MTT, as pastas Clorexidina, Maxitrol®, Sulfato de Neomicina+Bacitracina, os componentes clorexidina, PMCC e o propilenoglicol diminuíram a viabilidade celular em 24h. Em 72h, nenhum produto provocou diminuição da viabilidade celular e lipoperoxidação. A lipoperoxidação foi causada por pastas de hidróxido de cálcio, o hidróxido de cálcio e o iodofórmio em 24h. O aumento das ERO foi provocado pelas pastas Clorexidina, Guedes-Pinto, e pastas de hidróxido de cálcio, além dos produtos clorexidina, Sulfato de Neomicina+Bacitracina, PMCC, iodofórmio e hidróxido de cálcio em 24h, e pelo propilenoglicol, pastas iodoformadas e seus componentes, com exceção do iodofórmio, em 72h. No ensaio cometa, nenhuma pasta iodoformada danificou o DNA em ambos os tempos experimentais. Enquanto no GEMO, a pasta clorexidina mostrou efeito genotóxico. As pastas à base de hidróxido de cálcio e o hidróxido de cálcio causaram danos ao DNA nos dois ensaios. Concluiu-se que as pastas e componentes avaliados variaram quanto à capacidade de indução de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade. As pastas Guedes-Pinto, Maxitrol® e Sulfato de Neomicina+Bacitracina apresentaram melhor desempenho quanto à biocompatibilidade *in vitro*.

**Palavras-chave:** Materiais de Pulpectomia e Capeamento Pulpar. *Dente Decíduo. Teste de Biocompatibilidade.*



## ABSTRACT

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

### INDUCTION OF CYTOTOXICITY, OXIDATIVE STRESS, AND GENOTOXICITY BY ROOT FILLING PASTES USED IN PRIMARY TEETH

AUTHOR: CARINE WEBER PIRES

ADVISOR: JULIANA RODRIGUES PRAETZEL

Defense Place and Date: Santa Maria, August 5, 2014.

In addition to chemical–mechanical preparation, pulp therapy for primary teeth requires a root canal filling that is able to maintain the antimicrobial activity to sanitize the root canal. Since the materials are in close contact with the dental tissues, it is essential to perform biocompatibility testing to certify the safety of these products for clinical application. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity *in vitro* of four iodoform pastes, three calcium hydroxide pastes, and their main components. Peripheral blood mononuclear cells and DNA from calf thymus were exposed to extracts of these products. Cytotoxicity was assessed with an MTT assay. The generation of reactive oxygen species (ROS) was evaluated by a DCFH-DA assay, and lipid peroxidation was evaluated by a TBARS assay. The genotoxicity was evaluated using alkaline comet assay and GEMO assay. All tests were performed at 24 and 72 h, except for GEMO. After Kolmogorov–Smirnov test, the results were analyzed by Kruskal–Wallis and Dunn's test, ANOVA, and Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). In the MTT assay, the chlorhexidine, Maxitrol<sup>®</sup>, neomycin sulfate + bacitracin pastes, and their components (chlorhexidine, propylene glycol, and camphorated parachlorophenol) decreased cell viability after 24 h. After 72 h, no change was observed in cell viability and lipid peroxidation for any of the groups. Lipid peroxidation was observed with exposure to calcium hydroxide pastes, calcium hydroxide, and iodoform after 24 h. Exposure to chlorhexidine, Guedes-Pinto, calcium hydroxide pastes, chlorhexidine, neomycin sulfate + bacitracin, camphorated parachlorophenol, iodoform, and calcium hydroxide resulted in an increase in ROS after 24 h, whereas propylene glycol, iodoform pastes, and their components (except for iodoform alone), increased the ROS after 72 h. In the comet assay, damaged DNA was not present with exposure to iodoform pastes for both times. However, in the GEMO assay, the chlorhexidine paste showed genotoxic effects. Calcium hydroxide paste and calcium hydroxide caused DNA damage in both tests. Thus, the pastes and components varied in their ability to induce cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative stress. In general, the Guedes-Pinto, Maxitrol<sup>®</sup>, and neomycin sulfate + bacitracin pastes exhibited better biocompatibility *in vitro*.

**Keywords:** Pulp Capping and Pulpectomy Agents, Tooth, Deciduous, Material Testing.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Calen/OZ - Pasta Calen® espessada com óxido de zinco

CHX - Gel de gluconato de clorexidina 2%

CMSP - Células mononucleadas do sangue periférico humano

DCFH-DA - Teste de Diclorofluoresceína Diacetato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsDNA – DNA purificado de timo de bezerro

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GEMO – Teste da capacidade genomodificadora

HC - Hidróxido de cálcio P.A.

iodo - Iodofórmio

MAX - Pomada Maxitrol®

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

NaOH – Hidróxido de sódio

NEB - Pomada Sulfato de Neomicina + Bacitracina

PBS - Tampão fosfato-salino

PCHX- Pasta Clorexidina

PG - Propilenoglicol

PGP - Pasta Guedes-Pinto

PH - Pastas à base de hidróxido de cálcio

PHC/OZ - Pasta de hidróxido de cálcio espessada

PI - Pastas iodoformadas

PMAX - Pasta Maxitrol®

PMCC - Paramonoclorofenol canforado

PNEB - Pasta Sulfato de Neomicina + Bacitracina

RIF - Pomada Rifocort®

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute medium 1640

TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TE - Tampão tris-EDTA

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

UltraCal - Pasta UltraCal®XS

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<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> .....	30
<b>Referências</b> .....	31
<b>Lista de ilustrações</b> .....	35
Quadro 1 - Materiais que compõem as pastas obturadoras.....	36
Figura 1 - Resultados do Teste MTT, em 24h e 72h. ....	37
Figura 2. Resultados do Teste DCFH-DA, em 24h e 72h. ....	38
Figura 3. Resultados do Teste TBARS, em 24h e 72h. ....	39
Figura 4. Resultados do Ensaio Cometa Alcalino, em 24h e 72h. ....	40
Figura 5. Resultados do Teste GEMO. ....	41
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>ANEXOS</b> .....	50
Anexo A – Carta de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa .....	50
Anexo B – Normas para publicação no periódico International Endodontic Journal .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico em dentes decíduos é um procedimento complexo, pois a peculiar morfologia do sistema de canais radiculares desses dentes, com canais acessórios e conexões envolvendo bifurcações e anastomoses horizontais, dificulta a instrumentação mecânica, a irrigação e, conseqüentemente, a adequada limpeza dos mesmos (CARROTE, 2005; AMINABADI; FARAHANI; GAJAN, 2008; CLEGHORN; BOORBERG; CHRISTIE, 2012). Sendo assim, o preparo químico-mecânico deve ser complementado com o uso de um material obturador que elimine ou reduza os microrganismos, estabeleça o reparo dos tecidos doentes, mantenha a ação antibacteriana e previna a reinfecção do canal (SILVA et al., 2010).

Diante da existência de comunicação entre a polpa e ligamento periodontal (através do forame apical, canais laterais e canais acessórios) (POORNIMA; REDDY, 2008), e pelo fato dos materiais obturadores permanecerem em contato com os tecidos por um longo período de tempo (CAMARGO et al., 2009a), um requisito importante para o sucesso da terapia pulpar em dentes decíduos é a biocompatibilidade do material obturador (SARI; OKTE, 2008). Deste modo, é desejável que esse material não seja tóxico para os tecidos apicais e periapicais, e para o germe do dente permanente sucessor (HUANG et al., 2009). Apesar de ainda não existir um consenso quanto ao melhor material para obturação de dentes decíduos, as pastas à base de iodofórmio e à base de hidróxido de cálcio estão entre as mais comumente utilizadas (DUNSTON; COLL, 2008; BERGOLI et al., 2010).

Através dos resultados clínicos e radiográficos satisfatórios obtidos nos trabalhos de Rifkin (1980, 1982), o uso de pastas à base de iodofórmio foi amplamente dimensionado na endodontia de dentes decíduos. Essas pastas foram propostas por serem antissépticas e reabsorvíveis (BARCELOS et al., 2011). Além disso, possuem radiopacidade, característica atribuída à composição do iodofórmio (AYDOS; MILANO, 1984).

O iodofórmio, um sólido cristalino amarelo que pertence à família dos halogênios, é normalmente utilizado na prática odontológica como um antisséptico. A ação desse composto se deve à liberação de iodo nascente, que quando em contato com tecido biológico provoca uma ação desinfetante suave (SINGH; DAS; SHARMA, 2012). Segundo Tortora, Funke e Case (2005), o iodo é um dos antissépticos mais antigos e mais eficientes contra todos os tipos de bactérias, muitos endósporos, vários fungos e alguns vírus. Em um trabalho *in vitro* de Pallota, Ribeiro e Machado (2007), o iodofórmio demonstrou potencial antimicrobiano frente a bactérias resistentes encontradas em infecções endodônticas. Em adição a isso,

Franco, Machado e Nabeshima (2010), constataram que o iodofórmio transpõe ou gera produtos que transpõem as camadas de dentina ou do cimento, atingindo o ambiente extrarradicular. Sendo assim, é importante considerar a toxicidade individual desse material.

Em associação com o iodofórmio, outros compostos ou individualmente, o paramonoclorofenol é muito utilizado em odontologia. Ele consiste em um derivado do fenol, chamado de composto fenólico, que exerce a atividade antimicrobiana lesando a membrana plasmática bacteriana, desnaturando proteínas e inativando enzimas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Sua ação antibacteriana é complementada pela liberação lenta do íon cloro durante o uso (SOARES; GOLDBERG, 2001) e foi comprovada por estudos clínicos e laboratoriais que utilizaram bactérias comumente encontradas em infecções endodônticas (BARBOSA et al., 1997; FERREIRA et al., 2007; COSTA et al., 2008). No entanto, esse fármaco atua de forma efetiva apenas por contato direto, não obtendo resultados favoráveis pela liberação de vapores (ELLERBRUCH; MURPHY, 1977; ROCHA et al., 2010), e seu efeito é neutralizado na presença de matéria orgânica (SOARES; GOLDBERG, 2001).

O paramonoclorofenol foi associado à cânfora, formando o paramonoclorofenol canforado (PMCC), com o intuito de incluir um veículo e diminuir sua ação irritante aos tecidos vivos (SOARES; GOLDBERG, 2001). Porém, de acordo com um estudo que avaliou *in vitro* a citotoxicidade dos compostos fenólicos e veículo em células da polpa dentária de rato, a cânfora demonstrou citotoxicidade, e a adição de cânfora aumentou a toxicidade do paraclorofenol (SOEKANTO et al., 1996).

O PMCC é um dos componentes da pasta Guedes-Pinto (GUEDES-PINTO; PAIVA; BOZZOLA, 1981) - Iodofórmio, PMCC e Rifocort®, utilizada para a obturação de dentes decíduos. No trabalho de Santos e colaboradores (1999), foi avaliada a citotoxicidade individual dos componentes dessa pasta em cultura de fibroblastos e o PMCC mostrou ser o componente mais citotóxico. No entanto, a pasta demonstrou ser a menos tóxica entre os produtos testados (formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico), o que pode sugerir que em sinergia os componentes causem menos danos aos tecidos.

A pasta Guedes-Pinto possui comprovado potencial antimicrobiano (BONOW; GUEDES-PINTO; BAMMANN, 1996; SILVA; CANDELÁRIA; BOMBANA, 2002; AMORIM et al., 2006; PRAETZEL et al., 2008) e biocompatibilidade (MICHEL; GUEDES-PINTO; ARAÚJO, 1985; CHEDID; GUEDES-PINTO; ARAÚJO, 1992; FARACO-JUNIOR; PERCINOTO, 1998), o que justifica suas altas taxas de sucesso clínico e a ampla utilização em terapia pulpar de dentes decíduos (GUEDES-PINTO; PAIVA; BOZZOLA, 1981;

PUPPIN-RONTANI; PETERS; WORLICZECK, 1994). Entretanto, um de seus componentes, o Rifocort® não se encontra disponível no mercado atualmente, restringindo seu uso.

Antoniazzi e colaboradores (2014) propuseram a substituição desse fármaco por Gluconato de Clorexidina em gel a 2%, pela pomada Maxitrol® e pela pomada Nebacetin®. Neste estudo foi avaliada a eficácia antimicrobiana das associações Iodofórmio, PMCC e Gel de Gluconato de Clorexidina a 2%; Iodofórmio, PMCC e Maxitrol®; Iodofórmio, PMCC e Nebacetin®. Todas as associações farmacológicas à base de iodofórmio apresentaram desempenho semelhante à pasta de Guedes-Pinto, demonstrando elevado potencial antimicrobiano. Entretanto, na terapia pulpar de dentes decíduos, um equilíbrio entre a habilidade antibacteriana e a citocompatibilidade dessas pastas deve ser alcançado (HUANG; DING; KAO, 2007), sendo necessários mais estudos com essas associações e seus componentes, para que possam ser empregadas clinicamente em humanos.

O hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) possui capacidade de dissociar-se em íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), resultando em um elevado pH, o que promove a ativação da enzima fosfatase alcalina, favorecendo a deposição do tecido mineralizado e as propriedades antibacterianas (ESTRELA et al., 1995). A pasta à base de hidróxido de cálcio possui comprovada ação antimicrobiana (BONOW; GUEDES-PINTO; BAMMANN, 1996; AMORIM et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009, BLANSCET; TORDIK; GOODELL, 2008) e bom desempenho clínico (ROSENDAHL; WEINERT-GRODD, 1995; MANI et al., 2000, SARI; OKTE, 2008), obtendo melhores resultados que a pasta de óxido de zinco e eugenol (HENDRY et al., 1982; DAMLE; NADKARNI, 2005). Entre as desvantagens do uso dessa pasta está o elevado grau de solubilidade, pela rápida liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$ , deixando o canal radicular vazio em um curto período de tempo. Diante disso, a necessidade de espessar esse material com óxido de zinco a fim de que sua taxa de reabsorção se tornasse semelhante à reabsorção fisiológica do dente decíduo foi indicada (CHAWLA et al., 2001).

Na constituição das pastas, o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  é associado a um veículo, que pode ser aquoso, viscoso ou oleoso. A escolha do veículo é muito importante porque determina a consistência da pasta e a velocidade de dissociação iônica. Os veículos viscosos e oleosos determinam menor solubilidade da pasta que os aquosos. O polietilenoglicol e o propilenoglicol são exemplos de veículos viscosos (FAVA; SAUNDERS, 1999). A marca comercial Calen® contém  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  associado ao polietilenoglicol, sendo uma associação com amplo potencial antimicrobiano (QUEIROZ et al., 2009), assim como a mistura  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +propilenoglicol (CaPE) (AMORIM et al., 2006; SILVEIRA et al., 2011). Ximenes e Cardoso (2012) avaliaram a difusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  da associação CaPE e da pasta

Calen® através da dentina e do cimento de dentes decíduos, como resultado a CaPE demonstrou-se melhor. Contudo, associações de  $\text{Ca(OH)}_2$  com veículos aquosos também possuem bom desempenho contra microrganismos do canal radicular, como relatado em estudo que comparou diferentes formulações, sendo que aquelas contendo 50% a 60% de  $\text{Ca(OH)}_2$  com solução salina, ou 35% de  $\text{Ca(OH)}_2$  associado à metilcelulose (UltraCal®XS), obtiveram os melhores resultados (BLANCET; TORDIK; GOODELL, 2008).

A biocompatibilidade dos materiais endodônticos deve ser analisada sob vários aspectos como a citotoxicidade, histocompatibilidade, efeitos microbiológicos, carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade. Portanto, não é apropriado caracterizar biologicamente os materiais por uma única metodologia (HAUMAN; LOVE, 2003). Todavia, poucos estudos empregam mais de três testes para avaliação da biocompatibilidade. Portanto, estudos que avaliam a biocompatibilidade *in vitro* através de diversos testes em cultura celular, contemplando complexas características celulares, são de grande importância e relevância, e conseqüentemente, serão obtidos resultados mais completos se comparados a pesquisas com metodologia simples.

A citotoxicidade é definida como a capacidade de um material ter impacto sobre a viabilidade celular (PETERS, 2013). Testar essa propriedade consiste em colocar o material de forma direta ou indireta em contato com uma cultura de células de mamíferos, seguidos da análise das alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003). Segundo o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*) (ISO 10993-5, 2009), ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material. Entre os testes mais utilizados está o ensaio colorimétrico MTT, o qual avalia a viabilidade celular em função da atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983).

Embora a literatura disponha de muitos estudos sobre a citotoxicidade dos materiais obturadores endodônticos, verifica-se que apenas alguns deles avaliam o dano potencial que estes materiais podem causar no ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula (BIN et al., 2012). O fato de um material ter sido atestado como citocompatível, não significa que ele não tenha nenhuma genotoxicidade celular (DING et al., 2010). Desse modo, testes de genotoxicidade são essenciais para avaliar a toxicidade potencial em humanos, de modo que os riscos possam ser prevenidos (RIBEIRO, 2008a). O ensaio cometa é comumente utilizado e considerado uma boa ferramenta para a detecção de danos ao material genético das células, tais como quebra de DNA, quebra cromossômica, mutação genética e alteração na capacidade de reparo do DNA (RIBEIRO et al., 2006; RIBEIRO, 2008b).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram relatados em vários estudos precedentes sobre produtos usados na obturação endodôntica de dentes decíduos (SANTOS, 1998; CHANG et al., 1998; CHANG et al., 1999; LOPES-MAROTTI, 2003; CHEN, KAO, HUANG, 2005; HUANG; DING; KAO, 2007; SARIGOL et al., 2010). Estudos sobre efeitos genotóxicos e mutagênicos dos materiais endodônticos, relacionados aos dentes decíduos, também já foram publicados (RIBEIRO, 2008a; HUANG et al., 2009; LEITE et al., 2012), entretanto, a maioria deles não avaliou os produtos utilizados para essa finalidade especificamente. Assim, é relevante a realização de mais pesquisas que contribuam para elucidar o potencial genotóxico desses materiais.

No combate aos agentes tóxicos, existem os agentes antioxidantes atuando na proteção do organismo. Entretanto, se houver um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, como uma redução nas defesas antioxidantes e/ou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), pode ocorrer o estresse oxidativo. Caso esse persistir, essas ERO (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical hidroxila) podem causar danos oxidativos às estruturas celulares, incluindo os ácidos nucleicos, os lipídios e as proteínas. Assim, esses danos estão relacionados à indução de citotoxicidade, genotoxicidade e às mudanças no ciclo celular normal (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006; BARBIN et al., 2008). A avaliação da taxa total de ERO pode ser realizada através do teste com o reagente fluorescente Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (ESPOSTI, 2002). Enquanto que a verificação do potencial dano lipídico provocado pelas ERO pode ser realizada pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Na literatura existem estudos prévios que avaliam o estresse oxidativo associados aos materiais de capeamento pulpar (CAMARGO et al., 2009a), a cimentos endodônticos para dentes permanentes (CAMARGO et al., 2009b), aos monômeros resinosos (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006) e à clorexidina (BARBIN et al., 2008; BARBIN et al., 2013), porém ainda não existem estudos que avaliem esse parâmetro com pastas obturadoras para dentes decíduos.

Diante do exposto, a biocompatibilidade é, portanto, tão importante quanto características físicas e químicas ao selecionar um material para a terapia endodôntica. Assim, o presente estudo se justifica na necessidade de utilização de materiais seguros, além de eficazes, avaliando a biocompatibilidade *in vitro* das associações farmacológicas propostas para uso em terapia pulpar de dentes decíduos.



## **2. OBJETIVO**

Avaliar capacidade de pastas indicadas para obturação de dentes decíduos e seus principais componentes em causar citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro*.

### 3. ARTIGO

#### INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E GENOTOXICIDADE POR PASTAS OBTURADORAS PARA DENTES DECÍDUOS

**Carine Weber Pires<sup>1</sup>, Graziela Botton<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.

Palavras-chave: Materiais de pulpectomia e capeamento pulpar, dente decíduo, teste de biocompatibilidade.

***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

\* Artigo será enviado para o periódico *International Endodontic Journal*- Anexo

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a capacidade de quatro pastas iodoformadas, três pastas de hidróxido de cálcio, e seus principais componentes, em causar citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro*.

**Metodologia:** Células mononucleares de sangue periférico e DNA purificado de timo de bezerro (teste GEMO) foram expostos a extratos desses produtos. O ensaio MTT avaliou a citotoxicidade. A geração de espécies reativas de oxigênio foi avaliada pelo teste DCFH-DA, e a peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS. O Ensaio Cometa Alcalino e o GEMO avaliaram genotoxicidade. Todos os testes foram realizados em 24 e 72 horas, exceto o GEMO. Após teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os resultados foram analisados por Kruskal-Wallis e Dunn, ANOVA e Dunnet, com  $p < 0,05$ .

**Resultados:** No MTT, as pastas Clorexidina, Maxitrol®, Sulfato de Neomicina+Bacitracina, os componentes clorexidina, paramonoclorofenol canforado e o propilenoglicol diminuíram a viabilidade celular em 24h. Em 72h, nenhum produto provocou diminuição da viabilidade celular e lipoperoxidação. Houve lipoperoxidação diante de pastas de hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio e iodofórmio em 24h. O aumento das ERO foi provocado pelas pastas Clorexidina, Guedes-Pinto, e pastas de hidróxido de cálcio, além da clorexidina, Sulfato de Neomicina+Bacitracina, paramonoclorofenol canforado, iodofórmio e hidróxido de cálcio em 24h, e pelo propilenoglicol, pastas iodoformadas e seus componentes, exceto o iodofórmio, em 72h. No ensaio cometa, nenhuma pasta iodoformada danificou o DNA. No GEMO, a pasta clorexidina mostrou efeito genotóxico. As pastas à base de hidróxido de cálcio e o hidróxido de cálcio causaram danos ao DNA nos dois ensaios.

**Conclusão:** As pastas e componentes avaliados variaram quanto à capacidade de indução de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade. As pastas Guedes-Pinto, Maxitrol® e Sulfato de Neomicina+Bacitracina apresentaram melhor desempenho quanto à biocompatibilidade *in vitro*.

## Introdução

Pulpectomia é o tratamento indicado para dentes vitais em que o tecido pulpar está irreversivelmente infectado ou em dentes com tecido pulpar necrosado. Em especial nos dentes decíduos, existem condições que tecnicamente tornam-na complicada, como a complexa morfologia do sistema de canais radiculares, a reabsorção radicular fisiológica e a proximidade do sucessor permanente. A execução precisa de todas as etapas da técnica exerce grande influência no sucesso terapêutico (Rodd *et al.* 2006). Isso inclui a escolha por um material obturador que seja efetivo na eliminação ou redução das bactérias, previna a reinfecção, seja reabsorvível e não tóxico aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente (Huang *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010).

Atualmente existe uma crescente preferência pelo uso de pastas iodoformadas e pastas de hidróxido de cálcio (Dunston & Coll 2008, Bergoli *et al.* 2010), preterida a pasta de óxido de zinco e eugenol (Barcelos *et al.* 2011), provavelmente devido ao seu potencial irritante aos tecidos periapicais e lenta capacidade de reabsorção (Silva *et al.* 2010).

As pastas de hidróxido de cálcio são consideradas antimicrobianas por influência de seu elevado pH e pela liberação de íons hidroxila (Estrela *et al.* 1995). O hidróxido de cálcio é associado a diferentes veículos, e tanto veículos viscosos como aquosos contribuem para a fluidez, facilitando a inserção no canal radicular, e o bom desempenho antimicrobiano das mesmas (Fava & Saunders 1999, Blanscet *et al.* 2008).

As pastas iodoformadas são representadas por diversas formulações, mas de maneira geral, possuem bom comportamento biológico, elevado potencial antimicrobiano e sucesso clínico (Guedes-Pinto *et al.* 1981, Puppini-Rontani *et al.* 1994, Sarigol *et al.* 2010, Lacativa *et al.* 2012). Entre essas pastas está a pasta Guedes-Pinto (Guedes-Pinto *et al.* 1981), que possui ótimos resultados quanto a capacidade antimicrobiana, biocompatibilidade e sucesso clínico (Cerqueira *et al.* 2008), no entanto ainda não foi avaliada quanto a genotoxicidade.

Antoniazzi *et al.* (2014) propôs três novas associações farmacológicas como pastas obturadoras para dentes decíduos (iodofórmio e paramonoclorofenol canforado associados ao gel de clorexidina 2%, à pomada Maxitrol® e à pomada Nebacetin®) e testou a capacidade antimicrobiana *in vitro* das mesmas comparadas à pasta Guedes-Pinto, obtendo resultados satisfatórios. Na necessidade de haver um equilíbrio entre a habilidade antibacteriana e a citocompatibilidade dessas associações (Huang *et al.* 2007), mais estudos devem ser realizados para seu uso clínico.

A avaliação das propriedades biológicas de um material obturador requer a realização de testes iniciais, testes secundários e testes pré-clínicos (Lacativa *et al.* 2012). A avaliação inicial é realizada por testes básicos *in vitro*, cujos aspectos avaliados são o impacto do material sobre a viabilidade celular (citotoxicidade), a capacidade de induzir danos ao material genético das células (genotoxicidade), e ainda a ruptura do equilíbrio redox celular como resultado do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo causar danos oxidativos a ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Schweickl *et al.* 2006, Camargo *et al.* 2009).

Partindo-se da hipótese de igualdade entre a biocompatibilidade das pastas iodoformadas, das pastas de hidróxido de cálcio e seus componentes, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de pastas obturadoras e de seus principais componentes na indução de citotoxicidade, o estresse oxidativo e a genotoxicidade *in vitro*.

## **Materiais e Métodos**

### **Aprovação ética**

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

### **Grupos experimentais e preparo dos extratos**

Os grupos experimentais com as pastas obturadoras e materiais testados foram divididos em 16 grupos, com o controle (células em meio de cultura e tampão fosfato-salino (PBS)): a) pastas iodoformadas (PI) - pasta Clorexidina (PCHX), pasta Maxitrol® (PMAX), pasta Sulfato de Neomicina + Bacitracina (PNEB), pasta Guedes-Pinto (PGP); b) componentes das pastas iodoformadas – gel de gluconato de clorexidina 2% (CHX), pomada Maxitrol® (MAX), pomada Sulfato de Neomicina + Bacitracina (NEB), pomada Rifocort® (RIF), iodofórmio (IODO), paramonoclorofenol canforado (PMCC); c) pastas de hidróxido de cálcio (PH) - pasta Calen® espessada com óxido de zinco (Calen/OZ), pasta de hidróxido de

cálcio espessada (PHC/OZ), UltraCal®XS (UltraCal); d) componentes das pastas de hidróxido de cálcio - hidróxido de cálcio P.A. (HC), propilenoglicol (PG) (Quadro 1).

As pastas iodoformadas consistem em misturas proporcionadas de acordo com a pasta Guedes-Pinto (Guedes-Pinto *et al.* 1981), com iodofórmio (0,3g), paramonoclorofenol canforado (0,1mL) e pomada Rifocort® (0,25g), sendo que o único componente que alternava era a pomada, substituída por gel de gluconato de clorexidina a 2%; pomada Maxitrol® e pomada de Sulfato de Neomicina+Bacitracina. As pastas à base de hidróxido de cálcio foram representadas por três diferentes composições, sendo uma pasta composta por hidróxido de cálcio em pó e óxido de zinco em proporção de 3:1, e propilenoglicol, adicionado à mistura até a consistência de pasta de dente. As outras pastas foram a pasta Calen® (1g) espessada com óxido de zinco (0,65g) (Queiroz *et al.* 2011) e a pasta UltraCal®XS.

Para o preparo dos extratos, os materiais, com exceção dos líquidos, foram manipulados em placas de vidro, sob condições assépticas, em capela de fluxo. Os materiais em forma de pó, testados separadamente, foram misturados na proporção de 1g de pó para 1mL de meio de cultura celular, para obtenção de uma consistência pastosa. Todos os produtos e as associações foram inseridos em placas de cultura celular de 6 poços em um volume correspondente a 0,22mL por poço. Cada poço contendo os produtos foi preenchido com 2,5mL de meio de cultura celular RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino, suplementado com 1% de antimicrobianos penicilina/estreptomicina e 1% de antifúngico anfotericina B. Após, as placas permaneceram em estufa a 37°C por 24h (Bin *et al.* 2012).

## **Cultura celular**

As células selecionadas para execução dos testes foram células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) humano, oriundas de amostras de sangue total de descarte já processadas de indivíduos com idade média de 20 anos, não fumantes, não etilistas e não usuários de medicação crônica. As CMSP foram isoladas por gradiente de densidade, utilizando o reagente Ficoll (Histopaque®), com centrifugação a 1450 RPM por 30 minutos. Após a separação das células, estas foram dispostas em 3 placas de 6 poços contendo meio de cultivo RPMI 1640 completo. As células foram cultivadas a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/mL do extrato do material. Todavia, para a realização do teste GEMO, ensaio de avaliação genomodificadora, foi utilizado DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA) Invitrogen® (Eugene, OR, USA), não sendo utilizadas as CMSP.

## Tratamento das CMSP

Passado o período de 24h de incubação para o preparo do extrato, 1000µL de cada extrato (1:1) foi pipetado e colocado em contato com 1000µL de suspensão celular anteriormente plaqueada. Assim, a concentração final de cada extrato ficou em 1:2. As placas com os devidos tratamentos foram mantidas em estufa a 37°C, para posteriormente serem avaliadas, conforme os testes, em 24h e 72h.

Para a execução dos testes com CMSP, cada amostra foi coletada do poço de cultura e colocada em tubos de fundo cônico para centrifugação por 10 minutos a 2000 RPM e possibilitar a formação do *pellet* contendo as células tratadas. As células foram ressuspensas em 2mL de PBS (pH 7,4) para que não houvesse interferência da coloração do meio de cultura no resultados dos testes.

## Teste de citotoxicidade

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

Em placa de ELISA de 96 poços com as CMSP tratadas, 20µL do reagente MTT (a 5mg/mL, diluído em PBS) foi adicionado em cada poço. Após a incubação da placa por 1 hora a 37 C° (Fukui *et al.* 2010), foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 2000 RPM. Removido o sobrenadante dos poços, foi adicionado 200µL de DMSO, e, assim, realizada a centrifugação novamente, para que os cristais de formazan fossem liberados para o meio extracelular. O sobrenadante é, então, removido para ser realizada a leitura da absorbância com um espectrofotômetro em comprimento de onda de 570nm. O teste foi realizado em

triplicata e os valores obtidos para cada grupo foram calculados em relação à porcentagem do grupo controle, considerada como 100%.

### **Testes de estresse oxidativo**

Para verificar a taxa total de ERO foi realizado o teste de Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Esposti 2002). O reagente DCF-DA é desacetilado por enzimas esterases intracelulares formando diclorofluoresceína (DCFH), uma molécula não fluorescente que fica retido no interior da célula. Esta molécula é então oxidada a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) por ação de oxidantes celulares, principalmente o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), emitindo fluorescência. Após o tempo de tratamento, foi adicionado o reagente DCFH-DA ( $10\mu M$ ) em placa de ELISA preta com as CMSP, durante 1 hora a  $37^\circ C$ . A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro, a um comprimento de onda de excitação de 485nm e um comprimento de onda de emissão de 520nm. Quanto maior a fluorescência, mais elevada é a taxa de ERO gerada.

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído (MDA) é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) gera uma coloração que pode ser detectada por espectrofotômetro (Ohkawa *et al.* 1979). Foi produzida uma curva de MDA para posterior determinação dos equivalentes de cada tratamento em questão. Após duas lavagens com solução fisiológica (NaCl 0,9%) para eliminação de interferência de cor do meio de cultura celular, as células foram adicionadas de  $100\ \mu L$  de Butil-hidroxitolueno (BHT 10 mM),  $500\ \mu L$  de Ácido tricloroacético (TCA 20 %) e passaram por uma última etapa de centrifugação por 5 minutos a 2000 RPM. Após a centrifugação,  $900\ \mu L$  do sobrenadante foi misturado a um meio de reação contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,8%) e incubados a  $95^\circ C$ , em banho maria, por 1 hora. Resfriadas as amostras, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532 nm. O valor da absorbância foi diretamente proporcional à taxa de peroxidação lipídica.

Ambos os testes foram realizados em triplicata para cada um dos grupos experimentais.



## Testes de genotoxicidade

O ensaio cometa sob condições alcalinas é um teste de alta sensibilidade que possibilita quantificar os níveis de quebras de fita dupla e simples de DNA (Singh *et al.* 1988, 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 DMSO e 1mL de Triton X-100), para a remoção das membranas e citoplasma celular. Na sequência, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese alcalino com pH 13,0 (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 (nitrito de prata e carbonato de sódio a 5%), para que, então, o material genético pudesse ser analisado. Dois avaliadores experientes, cegos e treinados, analisaram cinquenta células por lâmina em microscópio óptico, em objetiva de 400 vezes, e classificaram as células de acordo com o formato da imagem, em quatro classes de dano, variando de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo). Os dados foram transformados em índice de dano (Montagner *et al.* 2010), e então submetidos a análise estatística.

O Teste de Capacidade Genomodificadora (GEMO) é um método realizado em placa preta de 96 poços, utilizando um corante altamente específico de DNA dupla-fita, o PicoGreen®, e DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA), diluídos em um T.E. tampão (10 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 7,5). O corante PicoGreen® é um reagente fluorescente ultrasensível que possibilita a quantificação de duplas fitas de DNA em solução. A cada poço contendo 10 µL de dsDNA (1µg/mL) foi acrescentado 100 µL do extrato de cada material, e esses permaneceram em contato por 30 minutos. Após o tratamento, o corante PicoGreen® (1:200 TE) foi adicionado aos poços e a fluorescência foi lida após cinco minutos à temperatura ambiente, em espectrofluorímetro a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Extratos que causam quebras nas duplas fitas de DNA são identificados pela diminuição da fluorescência quando comparado com o grupo controle, o qual continha apenas o dsDNA (Cadoná *et al.* 2014).

## Análise estatística

Os dados foram tabulados e expressos em média ( $\pm$ desvio padrão) usando três 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). Primeiramente, foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados dos testes MTT 24h, DCFH-DA 72h, TBARS 24 e 72h foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, enquanto que o MTT 72h, DCFH-DA 24h, Ensaio Cometa Alcalino e GEMO foram avaliados através de ANOVA seguido do teste *post hoc* de Dunnett. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

Os resultados dos testes de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade são demonstrados nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

Em relação à viabilidade celular, PCHX, PMAX, PNEB, CHX e PMCC provocaram a diminuição da viabilidade celular em 24h ( $p < 0,05$ ). Nenhuma PI e seus componentes diminuiram a viabilidade celular em 72h. Entre as PH, todas resultaram em altos níveis de viabilidade celular nos dois tempos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

Na avaliação da taxa total de ERO gerada nas CMSP, PCHX, CHX, NEB, PGP, IODO, PMCC e as PH aumentaram as taxas de ERO ( $p < 0,05$ ) em 24h. Em 72h, todas as PI e a maioria dos seus componentes (CHX, MAX, NEB, RIF, PMCC) provocaram aumento da produção de ERO ( $p < 0,05$ ). Nesse período, a PHC/OZ e o HC diminuiram da taxa total de ERO nas células ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

Nenhuma pasta iodoformada causou aumento nos níveis de TBARS em ambos os tempos experimentais. Em adição, apenas o componente IODO dessas associações provocou aumento nesses níveis em 24h ( $p < 0,05$ ). Nesse mesmo período, as PH aumentaram a taxa de peroxidação lipídica ( $p < 0,05$ ), não causando alterações nos níveis de TBARS em 72h ( $p > 0,05$ ) (Figura 3).

Quanto à genotoxicidade avaliada pelo ensaio cometa, nenhuma das PI danificou o DNA em ambos os tempos experimentais. Além disso, PMAX (72h), PGP e RIF (24 e 72h) apresentaram dano inferior ao nível basal de dano ao DNA ( $p < 0,05$ ). O CHX demonstrou genotoxicidade em ambos os tempos experimentais, enquanto NEB e PMCC em 72h. No teste GEMO, PCHX, CHX, MAX e NEB mostraram efeito genotóxico ( $p < 0,05$ ). As PH e o HC causaram dano ao DNA nos dois ensaios ( $p < 0,05$ ) (Figuras 4 e 5).

## Discussão

Nenhum experimento de forma isolada pode determinar a resposta final para os mecanismos subjacentes à resposta biológica dos biomateriais (Leirskar & Helgeland 1981, Hauman & Love 2003). Diante disso, no presente estudo foram realizados cinco testes *in vitro* relacionados à biocompatibilidade, a fim de buscar respostas iniciais a respeito da segurança do uso de materiais utilizados na obturação de dentes decíduos com a polpa comprometida. Apesar das limitações, os testes *in vitro* em cultura de células podem ser uma ferramenta adequada para elucidar o mecanismo de biocompatibilidade dos materiais dentários (Leirskar & Helgeland 1981), e possuem vantagens em relação a outros métodos por serem mais fáceis, mais rápidos e mais baratos.

As células alvo utilizadas foram leucócitos mononucleares de sangue periférico, linfócitos e monócitos. Os leucócitos são comumente utilizados na avaliação da citotoxicidade, assim como células epiteliais humanas (HeLa) e fibroblastos (Ciapetti *et al.* 1993, Hauman & Love 2003), além de fornecerem uma estimativa da exposição do organismo aos produtos com potencial genotóxico (Leite *et al.* 2012). Assim, já que os antissépticos do canal radicular, aplicados de maneira tópica, podem circular na corrente sanguínea, depois de penetrar a dentina no periodonto ou passando por forames e ramificações apicais (Bartelstone 1951, Tucker 1981), essas células representam o possível dano que os produtos testados podem provocar ao organismo.

É difícil comparar os resultados de diferentes experimentos com cultura de células devido às variações metodológicas, tais como o tipo celular, formas de contato, tempos experimentais (Sarigol *et al.* 2010), tipo de ensaio e as variadas concentrações e associações de substâncias. Assim, tem sido difícil discutir os resultados obtidos para alguns dos materiais testados, devido à falta de estudos anteriores.

Foram testadas associações dos produtos (PCHX, PMAX, PNEB, PGP, Calen/OZ, PHC/OZ e UltraCal) formando pastas para obturação de dentes decíduos, e seus principais componentes de forma isolada (CHX, MAX, NEB, RIF, IODO, PMCC, HC e PG). Isso porque quando se investiga o mecanismo de resposta biológica de materiais dentários é necessário avaliar os efeitos biológicos das substâncias liberadas separadamente e em combinação (Leirskar & Helgeland 1981).

O teste MTT é um método útil para avaliar a citotoxicidade de biomateriais e para revelar a toxicidade sutil de alguns materiais, que não causam morte celular rapidamente, isto é, dentro de 24-72h, tempo usual desse tipo de teste, mas são capazes de afetar o metabolismo e as funções da célula (Ciapetti *et al.* 1993). Contudo, esse é apenas um aspecto da biocompatibilidade e de forma isolada não pode caracterizar um material como sendo biocompatível ou não (Peters 2013).

A PGP não causou efeito sobre a viabilidade celular de CMSP, ratificando o comportamento favorável da mesma clinicamente (Guedes-Pinto *et al.* 1981, Puppini-Rontani *et al.* 1994). Entre as novas PI, todas causaram diminuição da viabilidade celular em 24h. Em 72h, PMAX e PNEB aumentaram significativamente a taxa de viabilidade celular, sugerindo um sutil potencial citotóxico. Isso pode ter sido influenciado pelo aumento da viabilidade celular causado pelas pomadas MAX, NEB e pelo IODO. O RIF também mostrou altos níveis de viabilidade (24-72h), mas em sinergia com IODO e PMCC não causou efeito na viabilidade celular.

A clorexidina é considerada citotóxica em culturas de células com diferentes linhagens (Giannelli *et al.* 2008), principalmente em maiores concentrações, como a utilizada nesse estudo. Isso corrobora em parte com os resultados encontrados, pois CHX demonstrou citotoxicidade apenas em 24h, não tendo efeito sobre a viabilidade celular em 72h. Isso ocorreu também com o PMCC, em concordância com estudos que atestaram a citotoxicidade desse composto em 24 horas, frente a fibroblastos pulpares humanos (Chang *et al.* 1998), e a células do ligamento periodontal humano (Chang *et al.* 1999).

A pasta de hidróxido de cálcio espessada por óxido de zinco foi avaliada através de dois grupos experimentais com formulações diferentes, porém ambas com veículos viscosos (Calen/OZ e PHC/OZ). A UltraCal®XS representa uma opção comercial cujo veículo, a metilcelulose, é aquoso. As PH provocaram aumento dos níveis de viabilidade celular nos dois tempos experimentais, sugerindo um potencial de leve toxicidade. Não existem relatos de estudos que avaliem a citotoxicidade dessas mesmas formulações em cultura de células, no entanto, estudos prévios que avaliaram a compatibilidade tecidual em tecido subcutâneo de

ratos demonstraram que a pasta Calen/OZ é mais biocompatível, comparada à pasta de óxido de zinco/eugenol e o cimento Sealapex® (Queiroz *et al.* 2011) e as pastas UltraCal®XS, Hydropast® e Calen® também apresentam citocompatibilidade (Andolfatto *et al.* 2012). Segundo Andolfatto *et al.* (2012) o PG não interfere na biocompatibilidade da pasta Hydropast, composta por HC, PG e sulfato de bário como radiopacificador, o que concorda com os achados deste trabalho, em que o PG obteve bons resultados na maioria dos testes.

As ERO fazem parte do metabolismo fisiológico humano, assumindo importante função biológica. Entretanto, é importante considerar que o aumento da produção de ERO nas células, poderá gerar estresse oxidativo. Se isso ocorrer, poderá desencadear danos oxidativos às estruturas celulares, incluindo os ácidos nucleicos, os lipídios e as proteínas (Schweickl *et al.* 2006). No presente estudo, o estresse oxidativo foi avaliado através do teste DCFH-DA e teste TBARS, que indicam a taxa de produção total de ERO e níveis de peroxidação dos lipídios da membrana celular, respectivamente. No presente estudo, PCHX e PGP aumentaram os níveis de ERO em 24h. Em 72h todas as PI demonstraram altos níveis de ERO em relação ao grupo controle, sendo a PCHX a que provocou maior aumento. Neste mesmo tempo experimental, os componentes das pastas acompanharam o aumento da produção de ERO, com exceção do IODO, que demonstrou potencial antioxidante. O comportamento do CHX, em associação ou isoladamente, pode ser justificado pelo estudo de Barbin *et al.* (2013) que identificou o agente citotóxico *para*-cloroanilina e ERO como subprodutos da solução aquosa de clorexidina a 2%. Além disso, esse material possui substantividade o que mantém sua ação nos tecidos por amplo período de tempo, elevando o potencial de risco dessa substância (Barbin *et al.* 2008).

As PI, as pomadas e o PMCC não causaram aumento nos níveis de peroxidação lipídica em nenhum dos tempos experimentais. Diante desses dados é possível sugerir que as associações à base de iodofórmio provocaram aumento da taxa total das ERO, porém as enzimas e o sistema de defesa antioxidante foram capazes de reparar esse desequilíbrio redox, ou pode-se propor que a predileção dessas ERO não se direciona aos lipídios, e sim aos ácidos nucleicos ou às proteínas.

Apesar de causar aumento das taxas de ERO em 24h, em 72h as Calen/OZ e UltraCal mostraram níveis semelhantes ao grupo controle, enquanto a PHC/OZ e HC demonstraram potencial antioxidante no maior período de exposição. No ensaio TBARS essas pastas apresentaram resultados semelhantes ao DCFH-DA em 24h, mas em 72h nenhuma PH ou componente avaliado causou dano oxidativo às estruturas lipídicas das células. Diante disso, é

possível sugerir que as PH e componentes não possuem potencial pró-oxidante em longo período de contato com as CMSP.

Alguns estudos compararam PI e PH. Como resultados, a pasta iodoformada avaliada demonstrou ser menos citotóxica em fibroblastos de roedores L929 (Sarigol *et al.* 2010), assim como apresentou níveis aceitáveis de biocompatibilidade em menor tempo através da avaliação histológica da técnica de implante intra-ósseo em porquinhos da Índia (Lacativa *et al.* 2012). Contudo, para Faraco-Junior & Percinoto (1998) tanto a PI quanto a PH apresentaram boa resposta dos tecidos periapicais após análise histológica de dentes pulpectomizados de cães, sendo que a PH obteve melhores resultados em relação à intensidade da inflamação e o grau de reabsorção. Mas Silva *et al.* (2010), que realizaram o mesmo tipo de análise histológica, demonstrou que a Calen/OZ apresentou a melhor resposta tecidual. Diante disso, verifica-se que ainda não existe um consenso quanto à melhor pasta, necessitando de mais estudos *in vivo* e clínicos que avaliem essa questão.

Alguns materiais utilizados na prática odontológica podem ser capazes de exercer atividade nociva sobre o material genético. Diante disso, ensaios de genotoxicidade são essenciais para estimar os danos genéticos causados por esses materiais, além de serem importantes indicadores de carcinogênese (Ribeiro 2008). Alguns estudos sobre efeitos genotóxicos e mutagênicos dos materiais endodônticos relacionados aos dentes decíduos também já foram publicados (Ribeiro 2008, Leite *et al.* 2012), porém sobre de pastas obturadoras para dentes decíduos existe apenas um até o momento (Huang *et al.* 2009).

No presente trabalho, a capacidade das pastas obturadoras e de seus componentes gerarem dano ao DNA foi avaliada através do Ensaio Cometa alcalino, e em complemento a esse, o GEMO, um teste novo que propõe quantificar o DNA dupla-fita exposto às substâncias químicas, classificando-as como potencialmente genotóxicas ou potencialmente genoprotetoras (Cadoná *et al.* 2014).

No ensaio cometa, nenhuma PI foi considerada genotóxica, demonstrando inclusive um efeito protetor ao DNA da PMAX e PGP, sustentado pelo comportamento do RIF. No entanto, no teste GEMO, a PCHX causou dano ao DNA, o que pode ser justificado pela genotoxicidade do CHX tanto no teste GEMO quanto no ensaio cometa. Isso está de acordo com estudos prévios que sugerem que a clorexidina, em concentração elevada como a utilizada neste estudo, possui potencial risco sistêmico pela produção de ERO, podendo causar lesões oxidativas ao DNA, e de *para*-cloroanilina, um possível agente carcinogênico em humanos (Barbin *et al.* 2008, Barbin *et al.* 2013).

O IODO não demonstrou potencial genotóxico em nenhum dos testes executados. Esses dados concordam com estudo prévio que nega a habilidade desse produto em induzir aberrações cromossômicas em células embrionárias de camundongo (Hikiba *et al.*, 2005). Contudo, discordam com estudo de Nishimura *et al.* (2008) em que esse produto demonstra induzir aberrações cromossômicas em células da polpa dental.

O PMCC não causou dano ao DNA em 24h, porém em 72h provocou esse efeito, indicando que um maior período de exposição a esse produto pode causar danos ao DNA celular. Em contraste, no teste GEMO o PMCC não foi genotóxico quando em contato direto com o dsDNA. Esse resultado corrobora com a maioria dos achados na literatura, os quais concluíram que o paramonoclorofenol, assim como o hidróxido de cálcio, não induziu quebras de fitas de DNA em variadas linhagens celulares, incluindo linfócitos humanos, células de ovário de hamster chinês, fibroblastos humanos e células de linfoma de rato (Ribeiro 2008) e em células da polpa dental (Nishimura *et al.* 2008).

Huang *et al.* (2009) demonstraram que nenhuma das pastas de hidróxido de cálcio testadas causou fragmentação do DNA em células de osteossarcoma humano. Em contraste, no presente estudo todas as PH e o HC causaram dano ao DNA em ambos os testes. Dentre esses produtos, a Calen/OZ causou menor dano. O fato do HC causar maior dano pode ser devido a alta concentração do produto utilizada neste estudo (500.000 µg/mL), indo de encontro a estudos que avaliaram maiores diluições, como 20, 40 e 80 µg/mL (Ribeiro 2008).

## **Conclusão**

Todas as pastas e componentes variaram quanto à capacidade de indução de citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade.

Considerando que:

- Apesar das PH não terem diminuído a viabilidade celular, as mesmas produziram ERO e dano oxidativo aos lipídios em 24h. Além disso, todas foram genotóxicas;
- Apesar da maioria das PI terem diminuído a viabilidade celular em 24h (exceto PGP), isso não se confirmou em 72h. Também, não causaram lipoperoxidação, entretanto, todas produziram ERO em 72h. Apenas a PCHX mostrou-se genotóxica (em um dos ensaios).

As pastas PGP, PMAX e PNEB apresentaram melhor desempenho quanto à biocompatibilidade *in vitro*.

A variação nos resultados encontrados mostra a necessidade da realização de mais estudos *in vitro* e *in vivo*, a fim de determinar a biocompatibilidade e a possibilidade de uso clínico das pastas obturadoras e seus componentes.

## Referências

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

Antoniuzzi BF, Pires CW, Bresolin CR, Weiss RN, Praetzel JR (2014) Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. *Brazilian Oral Research*. In press.

Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD (2008) Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* **34**, 1508-14.

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

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

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

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

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

Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG (2008) An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. *Journal of Endodontics* **34**, 1246-48.

Cadoná FC, Manica-Cattani MF, Machado AK *et al.* (2014) Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Analytical Methods*. In press.



Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *International Endodontic Journal* **42**,227–237.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LSS, Chou MY (1998) *In vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics* **24**, 604-6.

Chang YC, Tai KW, Chou LSS, Chou MY (1999) Effects of camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells *in vitro*. *Journal of Endodontics* **25**, 779-801.

Chawla HS, Mathur VP, Gauba K, Goyal A (2001) A mixture of Ca(OH)<sub>2</sub> paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* **19**, 107-9.

Chen CW, Kao CT, Huang TH (2005) Comparison of the biocompatibility between 2 endodontic filling materials for primary teeth. *Chinese Dental Journal* **24**, 28-35.

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.

Ding SJ, Kao CT, Chen CL, Shie MY, Huang TH (2010) Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. *Journal of Endodontics* **36**, 1158-1161.

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

Esposti, MD (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* **26**, 335-40.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal* **6**, 85-90.

Faraco-Junior IM, Percinoto C (1998) Avaliação de duas técnicas de pulpectomias em dentes decíduos. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* **52**, 400-04.

Fava LR, Saunders WP (1999) Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International Endodontic Journal* **32**, 257-82.

Fukui M, Yamabe N, Zhu BT (2010) Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Cancer* **46**, 1882-91.

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.

Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A (2008) Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology In Vitro* **22**, 308-17.

Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* **35**, 240-45.

Hauman CHJ, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* **36**, 75-85.

Hikiba H, Watanabe E, Barrett JC, Tsutsui T (2005) Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian Hamster Embryo cells. *Journal of Pharmacological Sciences* **97**, 146-152.

Huang TH, Ding SJ, Kao CT (2007) Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **80**, 486-490.

Huang TH, Hung C J, Chen YJ, Chien HC, Kao CT (2009) Cytologic effects of primary tooth endodontic filling materials. *Journal of Dental Sciences* **4**, 18-24.

Lacativa AM, Loyola AM, Sousa CJ (2012) Histological evaluation of bone response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. *Brazilian Dental Journal* **23**, 635-44.

Leirskar J, Helgeland K. (1981) Mechanism of toxicity of dental materials. *International Endodontic Journal* **14**, 42-7.

Leite AGL, Rosenblatt A, Calixto MS, Silva CM, Santos N (2012) Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. *Mutation Research* **747**, 93-7.

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

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

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.

Pallotta RC, Machado MEL, Reis NS, Martins GHR, Nabeshima CK (2010) Tissue inflammatory response to implantation of calcium hydroxide and iodoform in the back of rats. *Revista Odonto Ciência* **25**, 59-64.

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

Puppini-Rontani RMP, Peters CF, Worliczeck AT (1994) Pulpectomy in primary teeth: a clinical investigation. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, **48**, 1235-8.

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

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

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

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

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research* **85**, 870-7.

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

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.

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

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Quadro 1. Materiais que compõem as pastas obturadoras.

Figura 1. Resultados do Teste MTT, em 24h e 72h.

Figura 2. Resultados do Teste DCFH-DA, em 24h e 72h.

Figura 3. Resultados do Teste TBARS, em 24h e 72h.

Figura 4. Resultados do Ensaio Cometa Alcalino, em 24h e 72h.

Figura 5. Resultados do Teste GEMO.

Quadro 1. Materiais que compõem as pastas obturadoras

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

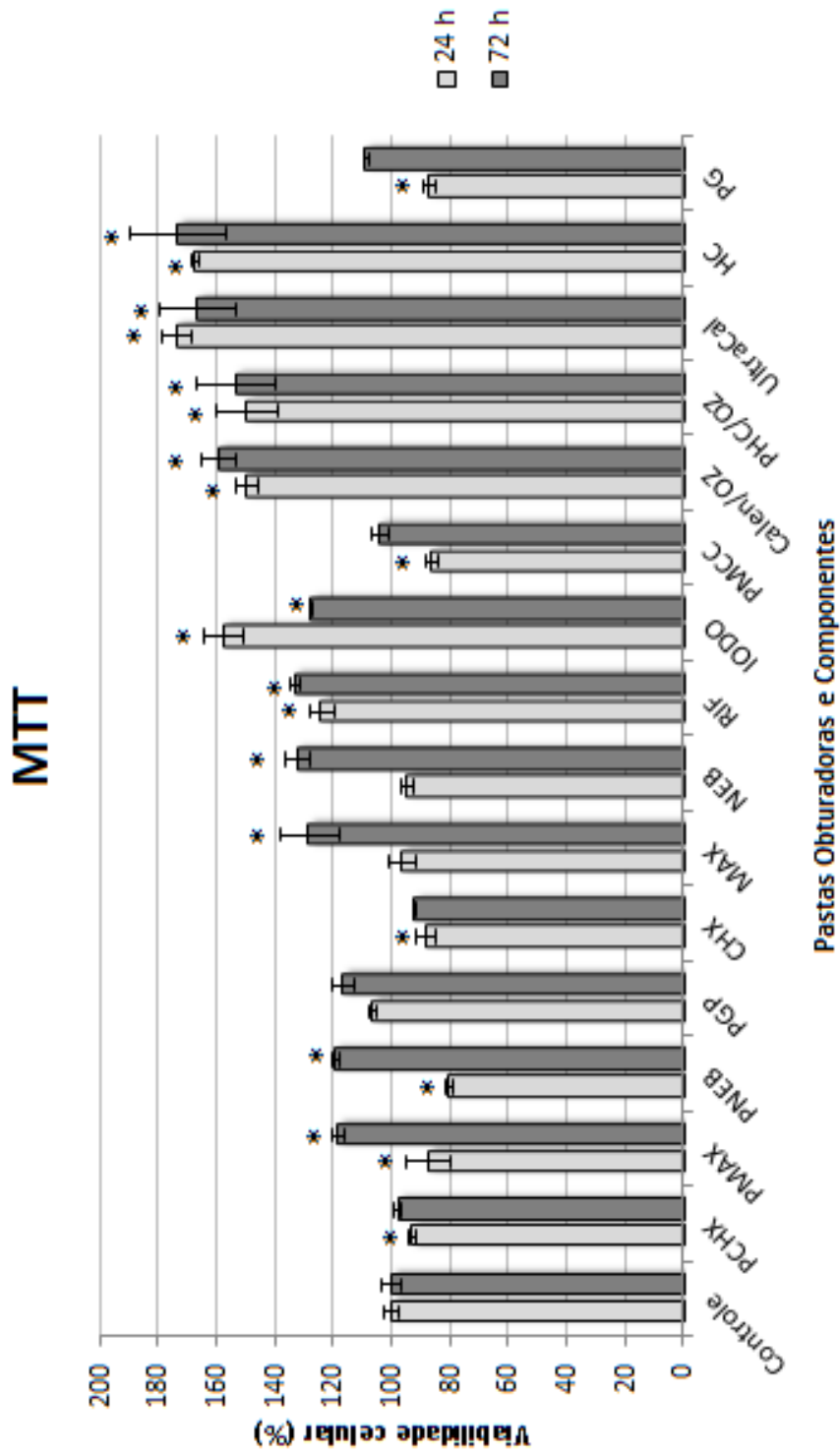


Figura 1. Resultados do Teste MTT, em 24h e 72h. Dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão).  
\*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

# DCFH-DA

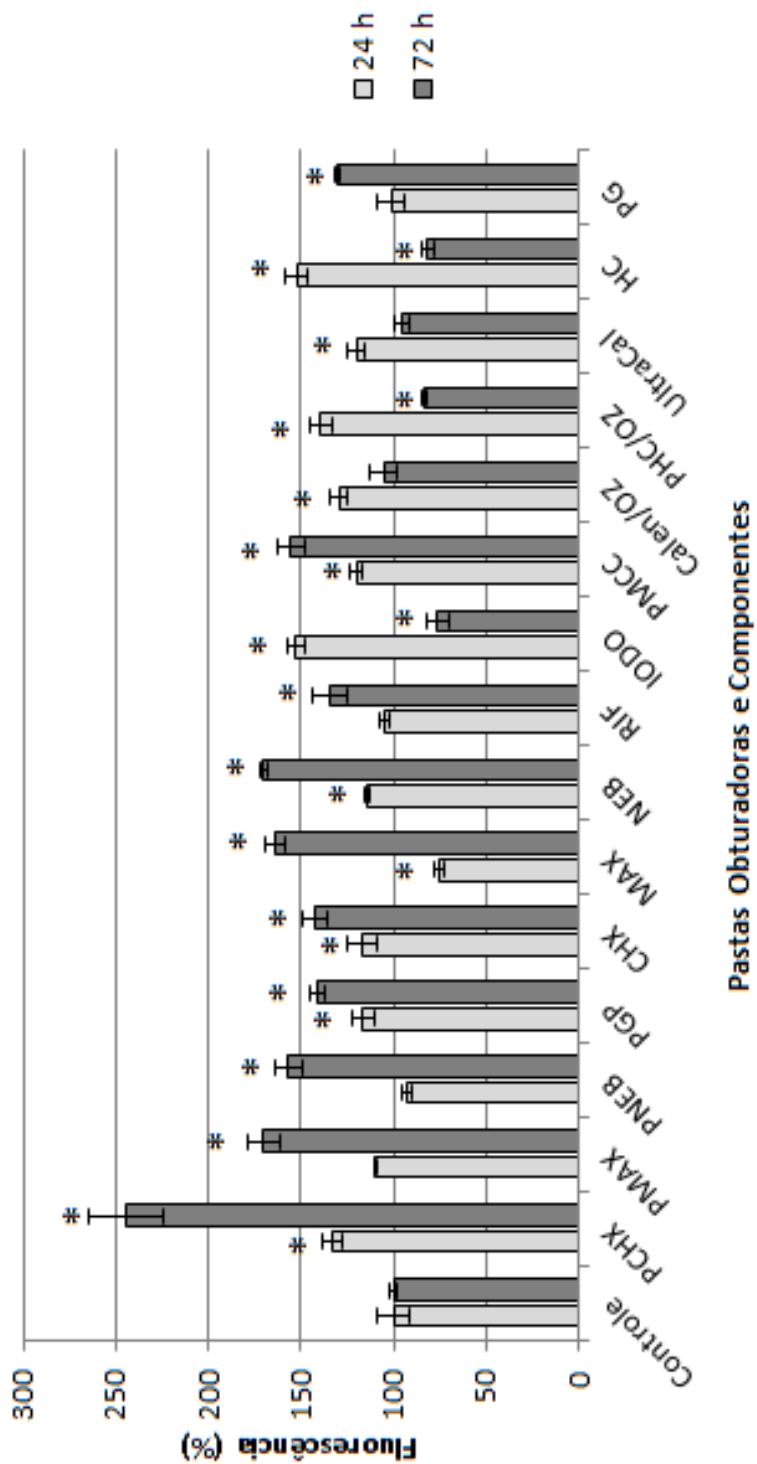


Figura 2. Resultados do Teste DCFH-DA, em 24h e 72h. Dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

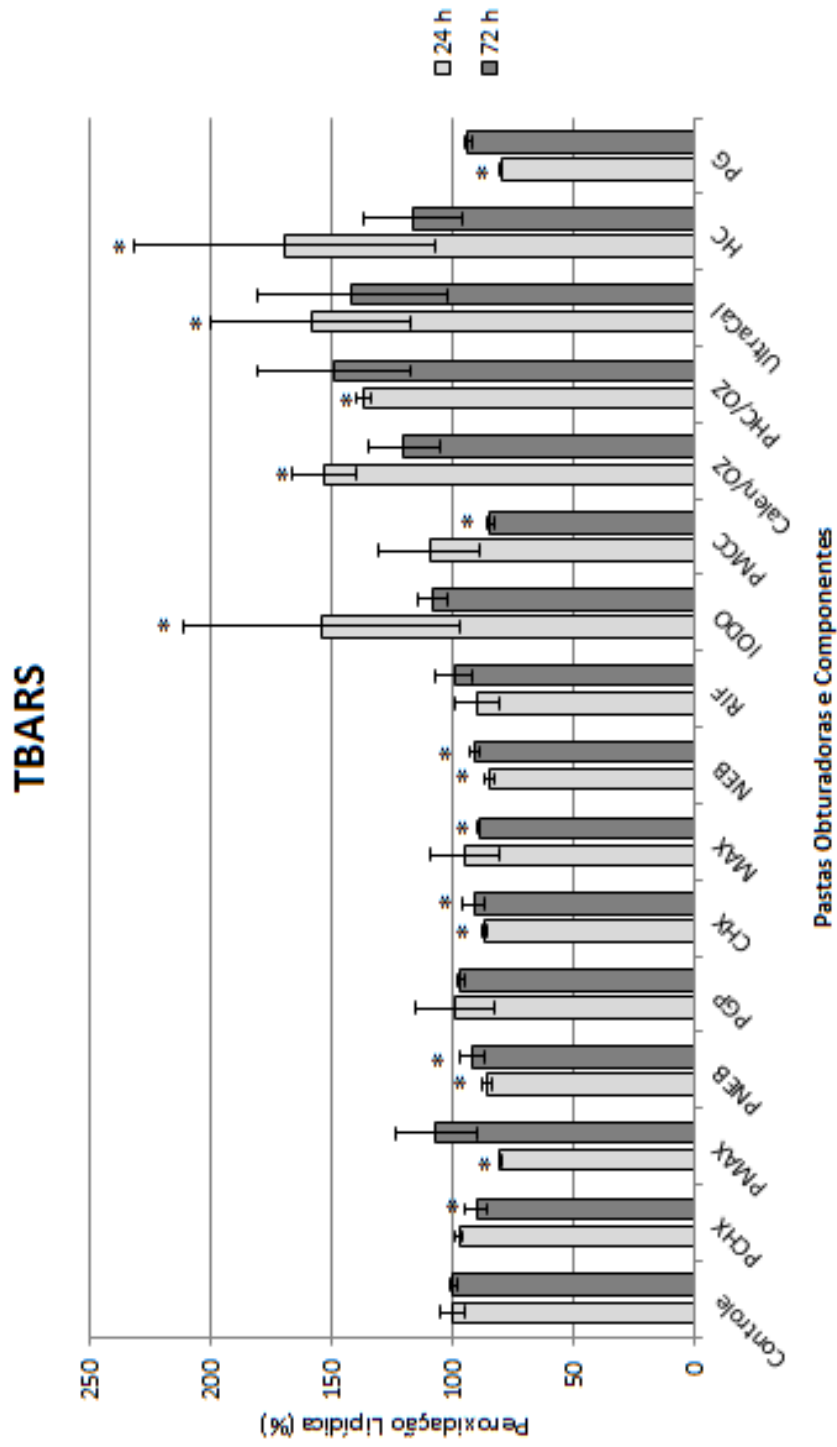


Figura 3. Resultados do Teste TBARS, em 24h e 72h. Dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.



## Ensaio Cometa Alcalino

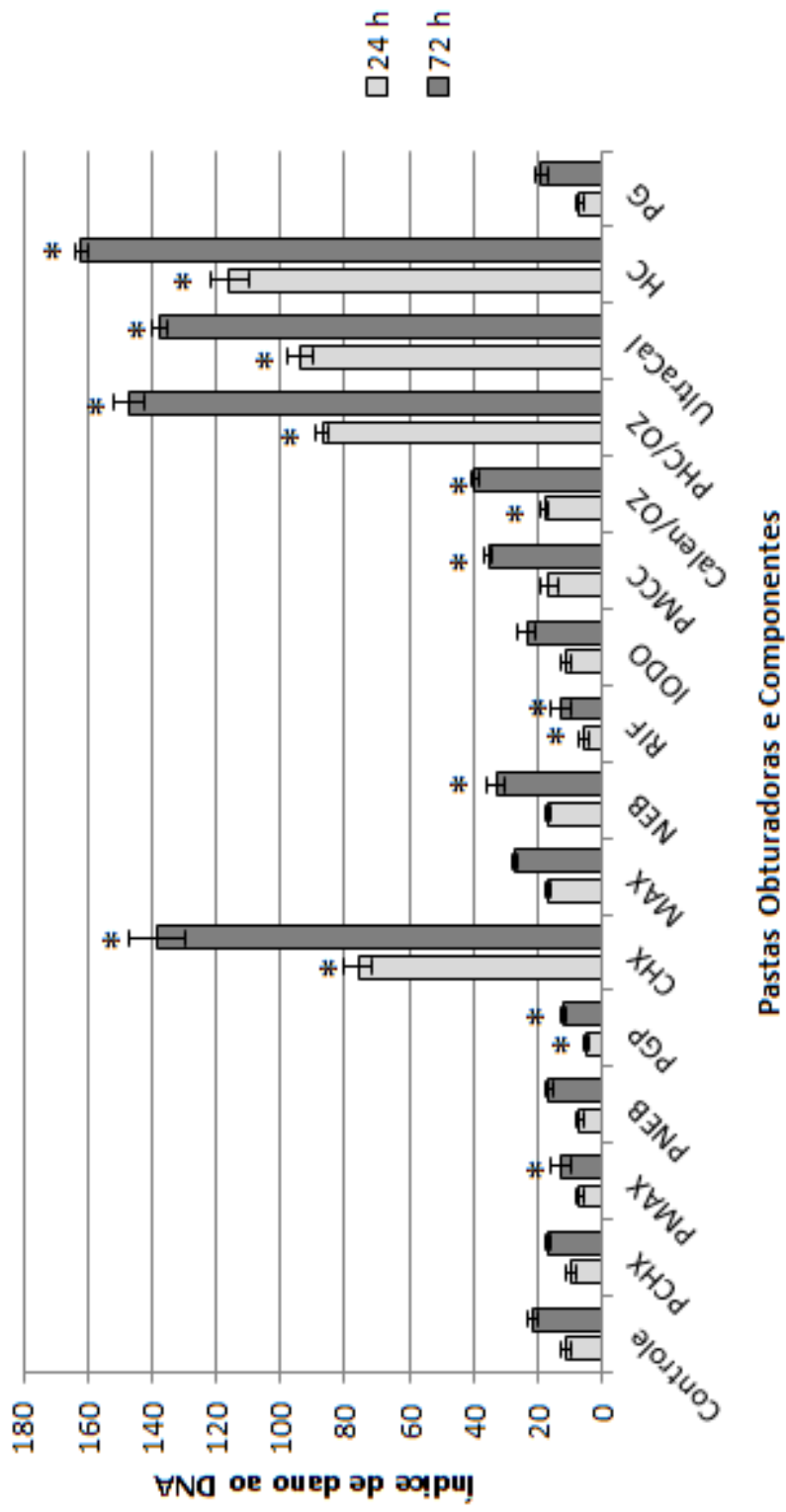


Figura 4. Resultados do Ensaio Cometa Alcalino, em 24h e 72h. Dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

# GEMO

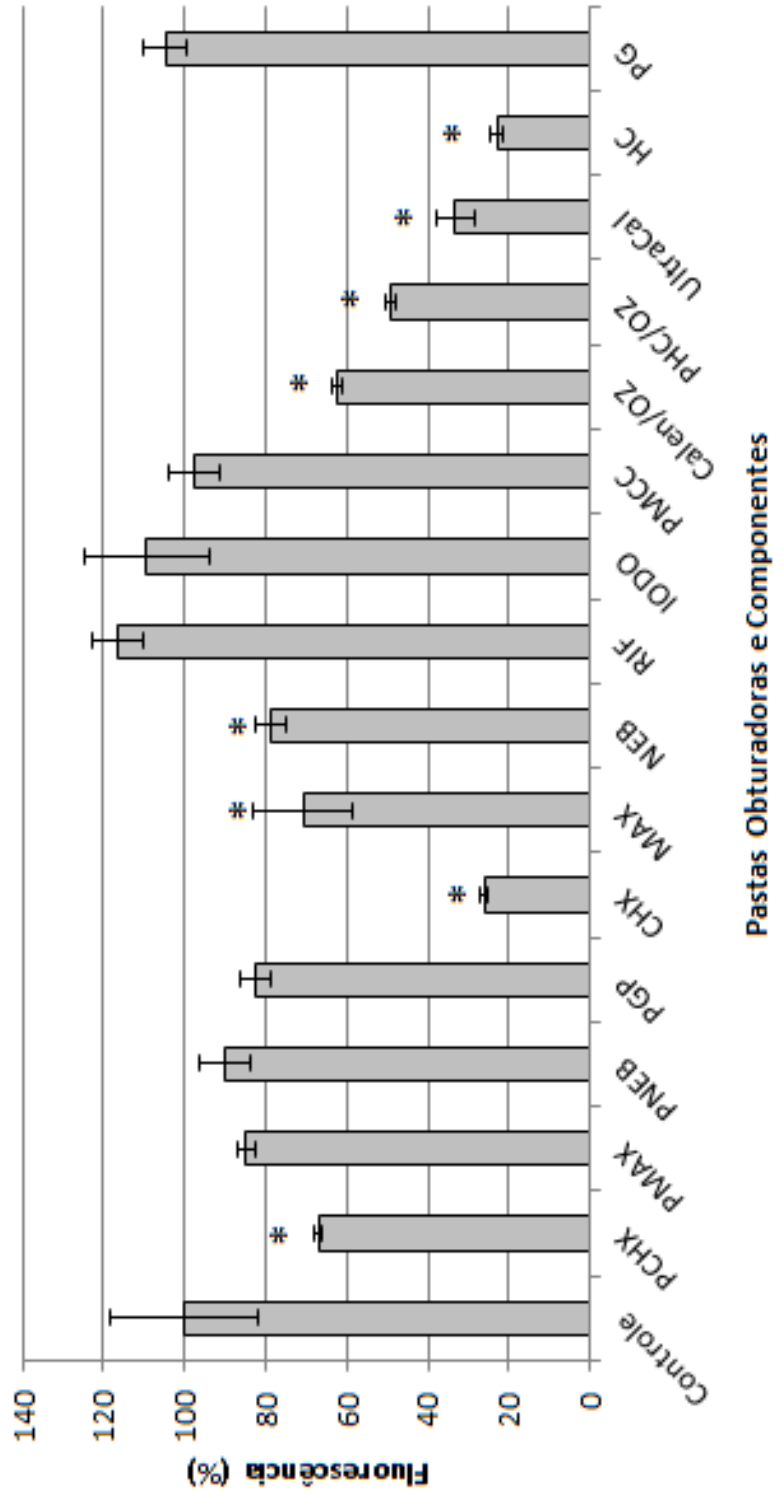


Figura 5. Resultados do Teste GEMO. Dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação avaliou a capacidade de pastas obturadoras de dentes decíduos e alguns de seus componentes em induzir citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro*.

A biocompatibilidade de um material consiste em uma propriedade tão importante quanto às características físicas e químicas. Os ensaios realizados nesse estudo são essenciais para verificação inicial da biocompatibilidade. Através deles foram testadas novas associações farmacológicas com produtos ainda não utilizados em Odontologia, assim como associações e materiais de uso estabelecido na terapia pulpar de dentes decíduos.

Enquanto testes de citotoxicidade são comuns na avaliação desse parâmetro em pastas obturadoras, ensaios de genotoxicidade são pouco realizados e trabalhos que avaliem a indução de dano oxidativo por materiais endodônticos são escassos. Isso torna esse estudo ainda mais relevante na literatura.

Apesar das limitações desse estudo *in vitro*, espera-se que esse tenha contribuído para eluciar a biocompatibilidade das pastas obturadoras que podem ser empregadas na pulpectomia de dentes decíduos. No entanto, esse representa um passo inicial para a determinação do uso seguro das mesmas em humanos, pois somente materiais com bom desempenho nesse tipo de estudo devem ser avaliados em experimentos com animais e testes clínicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMORIM, L. F. G. et al. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 4, p. 317-322. 2006.

ANTONIAZZI, BF; PIRES, CW; BRESOLIN, CR; WEISS, RN; PRAETZEL, JR. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. **Brazilian Oral Research**. 2014. In press.

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

BARBIN, L. E. et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 34, n, 12, p. 1508-1514. 2008.

BARBIN, L. E. et al. Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4-nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 664-668. 2013.

BARBOSA, C. A. M.; GONÇALVES, R. B.; SIQUEIRA JR, J. F.; UZEDA, M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 5, p. 297-300. 1997.

BARCELOS, R.; SANTOS, M. P. A.; PRIMO, L.G.; LUIZ, R. R.; MAIA, L.C. Zoe paste pulpectomies outcome in primary teeth: a systematic review. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 35, n. 3, p. 241-248. 2011.

BERGOLI, A. D. et al. Pulp therapy in primary teeth--profile of teaching in Brazilian dental schools. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 191-195. 2010.

BIN, C. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 495-500. 2012.

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

BONOW, M. L. M.; GUEDES-PINTO, A. C.; BAMMANN, L. L. Antimicrobial activity of drugs used in pulp therapy of deciduous teeth. **Brazilian Endodontic Journal**, v. 1, n. 1, p. 44-48. 1996.

CADONÁ, F. C. et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Analytical Methods**. 2014. In press.

CAMARGO, S. E. A. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. **International Endodontic Journal**, v. 42, n.3, p. 227–237. 2009a.

CAMARGO, C. H. et al. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 108, n. 6, p. 952-960. 2009b.

CARROTE, P. Endodontic treatment for children. **British Dental Journal**, v. 198, n. 1, p. 9-15. 2005.

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

CHAWLA, H. S. et al. A mixture of Ca(OH)<sub>2</sub> paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, v. 19, n. 3, p. 107-109. 2001.

CHEDID, R. R.; GUEDES-PINTO, A. C.; ARAÚJO, V. C. Reação da polpa ao tratamento endodôntico de decíduos. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 40, n.1, p. 25-28. 1992.

CLEGHORN, B. M.; BOORBERG, N. B.; CHRISTIE, W. H. Primary human teeth and their root canal systems. **Endodontic Topics**, v. 23, p. 6-23. 2012.

COSTA, E. M. M. B. et al. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em endodontia sobre o enterococcus faecalis. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 21-25. 2008.

DAMLE, S. G.; NADKARNI, U. M. Calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary molars: a comparative study. **Australian Endodontic Journal**, v. 31, n. 3, p. 114-119. 2005.

DING, S. J. et al. Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1158-1161. 2010.

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

ELLERBRUCH, E. S.; MURPHY, R. A. Antimicrobial activity of root canal medicament vapors. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 3, n. 5, p. 189-193, May 1977.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, p. 335-340. 2002.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 85-90. 1995.

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

FAVA, L. R.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 4, p. 257-282. 1999.

FERREIRA, F. B. A. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 104, p. 709-716. 2007.

FRANCO, A. B. G.; MACHADO, M. E. L.; NABESHIMA, C. K. Qualitative evaluation of iodoform diffusibility through dentin and cement. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 264-268. 2010.

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

HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 2, p.75-85. 2003.

HENDRY, J. A.; JEANSONNE, B. G.; DUMMETT, C. O. JR.; BURRELL, W. Comparison of calcium hydroxide and zinc oxide and eugenol pulpectomies in primary teeth of dogs. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v. 54, n. 4, p. 445-451.1982.

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

HUANG, T. H. et al. Cytologic effects of primary tooth endodontic filling materials. **Journal of Dental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 18-24. 2009.

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

LEITE, A. C. G. L. et al. Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. **Mutation Research**, v. 747, n. 1, p. 93-97. 2012.

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

MANI, S. A. et al. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 67, n. 2, p. 142-147. 2000.

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

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

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.

PALLOTTA, R. C.; RIBEIRO, M. S.; MACHADO, M. E. L. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. **Australian Endodontic Journal**, v. 33, p. 107-111. 2007.

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

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, p. 49-52. 2008.

PRAETZEL, J. R. et al. Antimicrobial Action of a filling paste used in pulp therapy in primary teeth under different storage conditions. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 33, n. 2, p. 27-30. 2008.

PUPPIN-RONTANI, R. M. P.; PETERS, C. F.; WORLICZECK, A. T. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com necrose pulpar. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v. 48, n. 1, p. 1235-8. 1994.

QUEIROZ, A. M. et al. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 4, p. 290-296. 2009.

RIBEIRO, D. A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of mineraltrioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells *in vitro*. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 101, n. 2, p. 258-26. 2006.

RIBEIRO, D. A. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, n. 2, p. 251-256. 2008a.

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. 2008b.



RIFKIN, A. A simple, effective, safe technique for the root canal treatment of abscessed primary teeth. **Journal of Dentistry for Children**, Baltimore, v. 47, n. 6, p. 435-441. 1980.

RIFKIN, A. The root canal treatment of abscessed primary teeth - a three to four year follow-up. **Journal of Dentistry for Children**, Baltimore, v. 49, n. 6, p. 428-431. 1982.

ROCHA, C. et al. Atividade antimicrobiana do PMCC por contato direto e vapor, frente ao *Enterococcus faecalis* e ao *Staphylococcus aureus*. **Stomatos**, Canoas, v. 16, n. 31, p. 45-54. 2010.

ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320. 2003.

ROSENDAHL, R.; WEINERT-GROOD, A. Root canal treatment of primary molars with infected pulps using calcium hydroxide as a root canal filling. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 19, n. 4, p. 255-258. 1995.

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

SANTOS, E. M. et al. Análise da citotoxicidade *in vitro* da Pasta Guedes-Pinto. In: 16º Reunião da SBPqO, 1999, São Paulo. **Anais do 16º Reunião da SBPqO**, 1999. v. 16. p. 22-22.

SARI, S.; OKTE, Z. Success rate of Sealapex in root canal treatment for primary teeth: 3-year follow-up. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, p. e93-e96. 2008.

SARIGOL, C. G. et al. Cytotoxic effects of primary tooth root canal filling materials on L929 cell line. **Journal of Dentistry for Children (Chic)**, v. 77, n. 2, p. 72-76. 2010.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 870-7. 2006

SILVA, C. M.; CANDELÁRIA, L. F. A.; BOMBANA, A. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana entre cinco pastas de obturação de canais de dentes decíduos. **Jornal**

**Brasileiro de Odontopediatria e Odontologia do Bebê**, Curitiba, v. 5, n. 28, p. 502-510. 2002.

SILVA, L. A. B. et al. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 1, p. 38-45. 2010.

SILVEIRA, C. F. et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **European Journal of Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1-7. 2011.

SINGH, V.; DAS, S.; SHARMA, N. K. Iodoform: A boon in disguise. **Open Journal of Stomatology**, v. 2, p. 322-325. 2012.

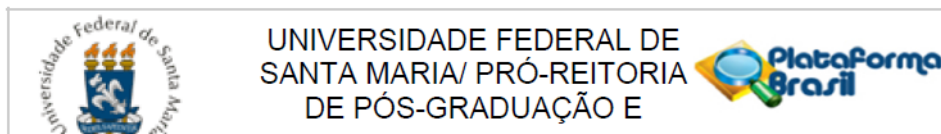
SOARES, I. J; GOLDBERG, F. **Endodontia**: princípios e fundamentos. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

SOEKANTO, A. et al. Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 8, p. 284-286. 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Controle de crescimento bacteriano. 8 ed. In: **Microbiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2005. p. 183-209.

XIMENES, M.; CARDOSO, M. Assessment of diffusion of hydroxyl and calcium ions of root canal filling materials in primary teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 34, n. 2, p. 122-126. 2012.

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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Juliana Rodrigues Praetzel

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 4

**CAAE:** 20457313.7.0000.5346

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 661.458

**Data da Relatoria:** 23/05/2014

#### Apresentação do Projeto:

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

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

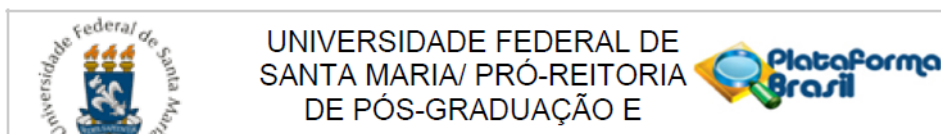
#### Objetivo da Pesquisa:

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

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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



Continuação do Parecer: 661.458

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

**BENEFÍCIOS:** conhecimento sobre o tema estudado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

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

Os documentos requeridos foram apresentados.

**Recomendações:**

.

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

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

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

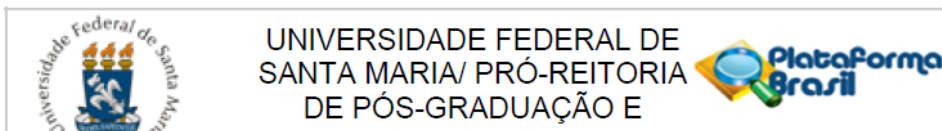
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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



Continuação do Parecer: 661.458

SANTA MARIA, 26 de Maio de 2014

---

Assinado por:  
CLAUDEMIR DE QUADROS  
(Coordenador)

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

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

### **Author Guidelines**

#### **GENERAL**

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

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

#### **ETHICAL APPROVALS**

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

#### **MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

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

### **1. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE**

#### **1.1. Format**

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

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

**Abbreviations:** *International Endodontic Journal* adheres to the conventions outlined in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated,

they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

## 1.2. Structure

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

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

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

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

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

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

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

(i) **Clinical Trials** should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](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 (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.