

GLEYCE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE DE DIFERENTES CIMENTOS
ENDODÔNTICOS EM FIBROBLASTOS V79**



2011

GLEYCE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DE DIFERENTES CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM FIBROBLASTOS
V79**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos,
2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

S38a Silva, Gleyce Oliveira
Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes cimentos
endodônticos em fibroblastos V79 / Gleyce Oliveira Silva. __ São José dos
Campos : [s.n.], 2011.
85f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

1. Cimentos dentários. 2. Agentes citotóxicos. 3. Genotoxicidade. 4. Ensaio
de micronúcleos. 5. MTT. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro. II.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos
Campos. III. Título

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de maio de 2011.

Assinatura :

E-mail: gleyce_olisil@msn.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

Faculdade de Odontologia de Taubaté

Universidade de Taubaté - UNITAU

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 15 de junho de 2011

DEDICATÓRIA

À Deus

Que em sua infinita bondade e amor sempre ilumina meu caminho e cuida de mim. Obrigada Senhor pela sua presença em minha vida.

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte,
não temerei mal algum, porque tu estás comigo;
o teu bordão e teu cajado me consolam.”

Salmo 23:4

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus queridos pais

Que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões com muito carinho e amor. Obrigada por me ensinarem os valores da vida para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço a Deus todos os dias por ter escolhido vocês como meus pais. Amo vocês!

À minha irmã Glaucia

Sempre disposta a ajudar nos momentos mais complicados. Obrigada por ser essa irmã linda e carinhosa. Amo muito você!

AGRADECIMENTOS

A toda minha família:

Obrigada pelo apoio e incentivo sempre. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos:

Obrigada por fazerem parte da minha vida, mesmo nos meus momentos de ausência. Vocês são muito importantes para mim.

Ao meu orientador:

Ique, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com você. Agradeço por toda sua dedicação, palavras de incentivo e confiança no meu trabalho. Obrigada por ser meu orientador e amigo.

Samira,

Muito obrigada por toda sua ajuda. Agradeço por todo o tempo dedicado a mim, sempre me socorrendo nos momentos de dúvida. Sou muito grata por tê-la presente em minha vida.

À professora Marcia,

Mesmo não sendo minha orientadora a senhora me ensinou muito sobre endodontia sendo pessoa importante na minha escolha por esta área. Obrigada pelo carinho, atenção e amizade.

Aos meus amigos do Mestrado:

Adriana, Ana Claudia, Claudia, Flávia, Mariana, Nadia e Patricia, tive muita sorte de conhecer e conviver com pessoas tão especiais como vocês. Compartilhamos momentos de alegria, angústia e muitas vezes de desespero; mas enfim, deu tudo certo. Tenho certeza que vocês terão um futuro brilhante. Obrigada por serem minhas amigas e por toda a ajuda sempre. Vocês moram no meu coração.

Tatiana, minha duplinha do coração. Tive muita sorte de ter você ao meu lado nestes dois anos de mestrado. Agradeço a Deus por sua amizade. Amo você!

Às meninas do Doutorado:

Aletéia e Sylvia, muito obrigada pela dedicação e ajuda em todo o trabalho realizado. Vocês são peças importantes na realização deste trabalho. Guardo vocês em meu coração.

Raffaela, obrigada pelo carinho. Sempre divertida ajudando aliviar as horas de estresse.

Aos professores Claudio, Ana Paula, Márcia Maciel, Renato e Lilian, obrigada por me ensinarem Endodontia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pelo apoio e carinho.

À FAPESP, pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODO.....	36
4.1 Cultivo das células.....	36
4.1.1 Descongelamento.....	37
4.1.2 Troca de meio.....	39
4.1.3 Subcultura.....	39
4.1.4 Contagem de células.....	41
4.2 Plaqueamento.....	42
4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular.....	43
4.4 Preparação dos extratos originais e diluições.....	43
4.5 Ensaio de citotoxicidade.....	47
4.6 Ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i>.....	49
4.7 Análise Estatística.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Teste de citotoxicidade.....	53
5.2 Teste de micronúcleo (MNT).....	56
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina.....	37
Figura 2 - a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) coleta das células V79 do tubo criogênico; c) inserção das células na garrafa de cultivo celular.....	38
Figura 3 - a) imagem microscópica (40x) indicando 80% de confluência das células V79; b) garrafas de cultivo celular para a realização da subcultura.....	40
Figura 4 - a) imagem microscópica (40x) das células V79 em um quadrante da câmara de Neubauer; b) pelet; c) suspensão celular sendo inserido na câmara de Neubauer.....	42
Figura 5 - Plaqueamento da suspensão celular em placa de 96 poços (5×10^3 células/poço). CN) sem células; CP) com células; 1:1 - 1:32) diluições.....	43
Figura 6 - a) espécimes do cimento RoekoSeal na placa de 24 poços; b) remoção de 2 mL de extratos de cada poço da placa de 24poços.....	46
Figura 7 - Extrato original (1:1) e suas diluições (1:2; 1:4;1:8; 1:16 e 1:32).....	46
Figura 8 - a) frasco de MTT; b) espectrofotômetro 570nm utilizado para leitura da placa; c) placa de 96 poços após aplicação de DMSO.....	49

Figura 9 - Placa retangular com lâmina de vidro estéril para cultivo celular utilizado no teste de MNT.....	52
Figura 10 - Citotoxicidade dos materiais em V79 após a exposição às diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As células foram expostas por 24 h, e a taxa de sobrevivência celular foi observada em quatro experimentos independentes. As barras representam as medianas (25-75% percentil) calculadas em histogramas individuais.....	55
Figura 11 - Formação de micronúcleos em células V79 após o tratamento com EndoREZ na diluição 1:8; seta indica micronúcleo de células contadas e círculo indica célula com mais de 5 micronúcleos não contada (aumento 100X).....	56
Figura 12 - Imagem de células V79 após o tratamento com EndoREZ na diluição 1:4 mostrando pouca atividade proliferativa das células (aumento 20X).....	57
Figura 13 - Imagem de células V79 após o tratamento com AH Plus na diluição 1:2 mostrando pouca atividade proliferativa das células e muitas células apoptóticas (aumento 100X).....	57
Figura 14 - Indução de micronúcleos em células V79 após a exposição aos materiais em diferentes diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As barras representam as medianas (25-75% percentil) e as medianas dos números de micronúcleos foram calculadas em relação ao grupo controle negativo. Diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle negativo e os grupos tratados são indicadas com asteriscos.....	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Composição dos cimentos endodônticos utilizados nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade.....	44
Tabela 1 - Tratamento das culturas celulares com diluições selecionadas para cada material e grupos controles.....	51
Tabela 2 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre V79, expressado em porcentagem de células viáveis. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil.....	54
Tabela 3 - Dunn (5%) para as diluições de todos os materiais.....	54
Tabela 4 - Formação de micronúcleos pelo contato das culturas celulares com extratos dos materiais sobre as células V79, expressos em micronúcleos por 1000 células, indicando os valores das médias e os percentuais 25% e 75%.....	58

Silva GO. Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos em fibroblastos V79 [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

Cimentos endodônticos podem liberar componentes tóxicos que interagem com os tecidos periapicais. A proposta deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de quatro cimentos endodônticos (EndoREZ, RoekoSeal, AHPlus e cimento experimental à base de óleo-resina da *Copaifera multijuga*) utilizando ensaios biológicos. Os cimentos foram mixados e incubados em estufa de umidade relativa a 37°C com 5% CO₂ por 24 h. A exposição do meio de cultura aos cimentos ocorreu após 12 h do endurecimento dos cimentos. Células V79 foram expostas às diluições dos extratos por 24 h e a sobrevivência celular foi mensurada fotometricamente. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT em espectrofotômetro e a genotoxicidade, indicada pela formação de micronúcleos, foi determinada após 24h do período de exposição. Os resultados da taxa de sobrevivência celular e a quantidade de danos ao DNA foram estatisticamente analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A citotoxicidade em relação ao grupo controle decresceu na seguinte ordem *EndoREZ* > *Copaíba* ≥ *AH Plus* > *RoekoSeal*. A formação de micronúcleos (MN) para indicar a genotoxicidade foi induzida somente pelos extratos do EndoREZ, sendo mais genotóxico que o EMS (controle positivo).

Palavras-Chave: Cimentos dentários. Agentes citotóxicos. Genotoxicidade. Ensaio de micronúcleos. MTT.

Silva GO. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of different root canal sealers in V79 cells [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Endodontic sealers could release toxic components that may interact with periapical tissues. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of four endodontic sealers (EndoREZ, RoekoSeal, AHPlus and experimental root canal sealer- based on Copalifera multijuga oil-resin) using routine cell biology techniques. The sealers were mixed and incubated in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ in air for 24 h. The exposure of the culture medium to the sealers occurred after 12 h of cure. V79 cells were exposed to dilutions of this extracts for 24 h and cell survival was measured photometrically. The cell viability was measured by MTT test in a spectrophotometer and the genotoxicity as indicated by the formation of micronuclei was determined after a 24 h exposure period. The results of the cell survival rates and the amount of DNA damage was statistically analyzed for Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$) test. The ranking of cell survival from the most to the least toxic material was: EndoREZ > Copalíba \geq AH Plus > RoekoSeal. The formation of micronuclei (MN) to indicate genotoxicity was induced only by extracts of EndoREZ, being more genotoxic than EMS (positive control).

Keywords: *Endodontic sealers. Cytotoxicity. Genotoxicity. Micronucleus test. MTT.*

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é indicado visando a manutenção do elemento dental na cavidade bucal e a saúde dos tecidos circundantes. O sucesso deste tratamento está diretamente correlacionado à correta execução de suas fases operatórias incluindo o preparo biomecânico, a desinfecção dos sistemas de canais radiculares, o controle de reação inflamatória e a obturação endodôntica.

A obturação endodôntica consiste no preenchimento do canal radicular por materiais com adequadas propriedades físico-químicas e biologicamente compatíveis, visando promover sua impermeabilização, não interferindo e, preferencialmente, estimulando o processo de reparo (Schwarze et al., 2002). Além disso, impedindo que possíveis microrganismos remanescentes à terapêutica endodôntica possam proliferar e promover recorrência de irritação na região apical (Leal, 1998).

Pesquisadores têm listado ao longo do tempo as propriedades que os cimentos obturadores devem possuir para exercer um bom comportamento junto ao sistema de canais radiculares e aos tecidos periapicais (Kim et al., 2004).

As propriedades biológicas e de impermeabilização dos cimentos endodônticos são importantes para o sucesso clínico, pois mesmo na ausência de extravasamento ocorre um contato íntimo entre os cimentos endodônticos e os tecidos periapicais adjacentes após o tratamento endodôntico (Waltimo et al., 2001).

Portanto, técnica e material ideais, ainda é um objetivo a ser alcançado na Endodontia, uma vez que a microinfiltração desencadeada pela falta de vedamento adequado entre o material

obturador e as paredes do canal radicular ainda persiste como um dos maiores problemas pós-tratamento endodôntico (Bouillaguet et al., 2004).

A utilização de técnicas e materiais que preservem a vitalidade apical e não interfiram negativamente no processo de reparo periapical devem ser aplicadas uma vez que a resposta dos tecidos a estes materiais são importantes e podem influenciar o sucesso do tratamento endodôntico (Brzovic et al., 2009).

Portanto, idealizam-se cimentos endodônticos que apresentem boa tolerância tecidual e estabilidade dimensional satisfatória, que permitam um vedamento hermético do sistema de canais radiculares, sejam reabsorvíveis nos tecidos periapicais e não no interior dos canais radiculares (Huang et al., 2002), possuam bom escoamento, boa adesividade, radiopacidade satisfatória, não prejudiquem ou se possível induzam reparação periapical. Porém, quando avaliamos o comportamento dos diferentes cimentos endodônticos que buscam aliar propriedades físicas, químicas e biológicas, verifica-se que cada tipo específico de cimento sempre apresenta vantagens e desvantagens.

Muitos cimentos endodônticos são utilizados clinicamente, entretanto todos apresentam limitações significantes (Bouillaguet et al., 2004). Cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol apresentam alto potencial citotóxico devido a irritabilidade proporcionada pelo eugenol (Hume, 1986; Schmalz et al., 2000; Schwarze et al., 2002). Os cimentos que contêm hidróxido de cálcio induzem mineralização, mas podem dissolver ao longo do tempo podendo comprometer a impermeabilização do canal radicular (Hovland e Dumsha, 1985; Huang et al., 2002). Cimentos à base de ionômero de vidro são capazes de aderir às estruturas dentárias, mas podem ativar a liberação de prostaglandinas nos tecidos periapicais (Willershausen et al., 2000), além disso possuem escoamento inadequado. Embora os cimentos resinosos tenham alcançado grande popularidade, estes são capazes de promover citotoxicidade e mutagenicidade (Schweikl et al., 1998; Huang et al.,

2002). Mais recentemente, materiais à base de silicone têm sido desenvolvidos como cimentos endodônticos e estudos demonstram resultados promissores pelo fato de serem estáveis e inertes aos tecidos apicais (Wu et al., 2002; Huuonen et al., 2003).

Atualmente, a linha de pesquisa Fitoterápica aplicada à Endodontia tem sido bastante explorada no intuito de obter produtos menos agressivos, mais biocompatíveis e com custo mais acessível. Um novo cimento à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* (copaíba), uma planta medicinal tradicional da região Amazônica, associado ao hidróxido de cálcio e óxido de zinco, tem sido introduzido na Odontologia. O óleo-resina de copaíba é um produto extraído de várias espécies do gênero *Copaifera* e é utilizado há muito tempo pelos índios para tratamento de feridas, devido aos seus efeitos antiinflamatórios, antitumorais, antisépticos, ação germicida, antibacterianos e antifúngicos (Vasconcelos et al., 2008).

A biocompatibilidade é o requisito mínimo para o contato dos materiais com os tecidos biológicos. Qualquer material estranho aos tecidos vivos provoca uma resposta, e não é a resposta em si, mas sua extensão, intensidade e duração que determinam o seu comportamento biológico (Calixto et al., 2001). Portanto, o conhecimento dos mecanismos de uma possível citotoxicidade dos cimentos endodônticos é necessário antes da sua utilização clínica na obturação dos canais radiculares buscando a reparação dos tecidos periapicais.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência de células são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, sendo uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade do que um teste executado em animais (Camps, About, 2003; Souza et al., 2006) e ainda permitem avaliar os complexos mecanismos homeostáticos que ocorrem *in vivo* (Ribeiro et al., 2005). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagem a facilidade no controle dos fatores

experimentais que são freqüentemente um problema em experimentos *in vivo* (Hensten-Pettersen, 1988; Scelza et al., 2001; Camps, About 2003).

A determinação da viabilidade bem como da toxicidade celular podem ser interpretadas pela marcação celular com cromo radioativo (Pascon et al., 2001), identificação do halo de inibição por contato direto material/célula, mensuração do grau de destruição da monocamada celular, contagem de células por exclusão com azul de Trypan (Scelza et al., 2001; Cavalcanti et al., 2005), entre outros. O método de avaliação da toxicidade pelo uso do corante MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) é extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível, refletindo não somente o número de células em uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, pois baseia-se na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase (Schwarze et al., 2002).

Os resultados utilizando métodos de cultura celular para avaliar a citotoxicidade têm demonstrado que qualquer cimento endodôntico pode se mostrar tóxico ou não-tóxico, dependendo das condições do teste (Oztan et al., 2003; Miletic et al., 2005), como exemplo o tempo de endurecimento do cimento, características individuais de endurecimento de cada cimento (umidade, presença de oxigênio, etc.), relação área do cimento com o volume de meio de cultura a ser condicionado e as características particulares das culturas celulares testadas.

Na literatura observa-se que muitos estudos estão focados em avaliações citotóxicas, enquanto verifica-se poucos dados publicados indicando a possível atividade genotóxica como um dos fatores que influenciam na biocompatibilidade dos materiais (Tai et al., 2001; Brzovic et al., 2009).

Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* e são designados para detectar componentes que induzem danos no material genético das células tais como quebra de

DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Dallan, 2004; Ribeiro et al., 2006a; Ribeiro et al., 2006b). Nas últimas décadas, ensaios de genotoxicidade têm alcançado ampla aceitação como um importante indicador carcinogênico, pois, os genomas das células podem diminuir significativamente o potencial de autoreparação tecidual e podem causar o desenvolvimento de neoplasias após longos períodos (Brzovic et al., 2009). Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* destacam-se o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2006a) e o teste de micronúcleo (Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

O teste de micronúcleo (MNT) é utilizado para detecção de mutações cromossômicas. Este teste detecta agentes clastogênicos e aneugênicos porque fragmentos cromossômicos e cromossomos atrasados conduzem à formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular (Schweikl et al., 1998; Schweikl e Schmalz, 2000).

O dano da membrana celular, inibição de atividades enzimáticas, ou proteínas, síntese de RNA e DNA, ou a simples estimativa do número de células sobreviventes após o tratamento com materiais dentários são alguns indicadores utilizados para análise de modificações no metabolismo celular.

Os achados atuais suscitam dúvidas na utilização dos materiais de obturação dos canais radiculares, que podem ser responsáveis pela completa reparação dos tecidos periapicais após o tratamento endodôntico (Leonardo et al., 2008). Acredita-se que a reação do tecido periapical pode ser diferente entre os produtos disponíveis, dependendo do comportamento biológico, podendo causar danos importantes a este tecido. Além disso, é importante avaliar se estes materiais são capazes de causar danos ao material genético das células do periodonto apical.

Assim, a hipótese deste estudo foi a que cimentos endodônticos à base de resina podem afetar mais as propriedades biológicas de células do que os cimentos à base de silicone e fitoterápico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cimentos endodônticos e suas propriedades

A obturação do canal radicular consiste em impedir o desenvolvimento bacteriano e o acúmulo de líquidos teciduais, além de permitir a reparação de lesões e o selamento biológico. Para tanto os cimentos endodônticos devem possuir propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias como, facilidade de inserção, impermeabilidade, bom tempo de trabalho, ser plástico no momento da inserção tornando-se sólido posteriormente, não manchar as estruturas dentárias ou tecidos moles, não ser solubilizado dentro do canal radicular, ser radiopaco, propiciar bom selamento, não sofrer contrações, possuir bom escoamento, viscosidade e aderência, ser de fácil remoção, possuir pH próximo ao neutro, ser passível de esterilização, ser absorvido no periápice, ter atividade bactericida e/ou bacteriostática, estimular ou permitir a deposição de tecido mineralizado e apresentar boa tolerância tecidual.

O AH Plus é um cimento comumente utilizado na prática clínica sendo composto por duas pastas desenvolvidas a partir da química das resinas epóxicas, apresentando fácil manipulação, boa adaptação às paredes do canal radicular e estabilidade dimensional a longo prazo (Schafer, Zandbiglari, 2003; Versiani et al., 2006). Frequentemente é utilizado como material de controle em pesquisas (Orstavik, 2005).

Atualmente, um novo cimento à base de silicone polidimetilsiloxano (RoekoSeal) foi introduzido no mercado e tem mostrado boas propriedades físico-químicas, como adequada fluidez

(Testarelli et al. 2003), baixa ocorrência de infiltração apical (Cobankara et al., 2002; Wu et al., 2006), além de baixa citotoxicidade (Miletic et al., 2005; Lodiene et al., 2008). O silicone é um material inerte amplamente utilizado na medicina como um material de implante (Habal, 1984; Deva et al., 1998), sendo que na Odontologia alguns estudos têm sido desenvolvidos para análise deste material.

Um estudo *in vitro* sobre as propriedades físicas e químicas de materiais à base de silicone mostrou que o cimento endodôntico RoekoSeal apresentou boa estabilidade dimensional e preveniu a infiltração por um período mínimo de 1 ano (Wu et al., 2006)

Leonardo et al. (2008) avaliaram a biocompatibilidade do RoekoSeal com os tecidos periapicais de cães e compararam com o AH Plus. As polpas de 32 dentes foram removidas, o cimento apical foi perfurado, preparo biomecânico realizado, e os canais foram obturados pela técnica de condensação lateral. Noventa dias após cirurgia, os animais sofreram eutanásia, o bloco dente e osso foi removido, e as amostras foram preparadas para análise microscópica. No grupo RoekoSeal, foi observada deposição de tecido mineralizado, com completa neoformação de tecido apical em 43,8% dos dentes e selamento parcial em 56,2%. No grupo AH Plus, em 12,5% houve completa neoformação de tecido apical mineralizado, em 75% o selamento foi parcial, e em 12,5% não houve selamento. Não houve diferença entre os grupos em relação ao infiltrado inflamatório; espessura do ligamento periodontal; e reabsorção de dentina, cimento ou osso. O RoekoSeal mostrou respostas biológicas satisfatórias quando comparado aos efeitos do AH Plus.

O EndoREZ é um material radiopaco, hidrofílico à base de metacrilato (Bergmans et al., 2005; Tay et al., 2005; Hammad et al., 2008; Zmener et al., 2008) que pode ser usado em canais radiculares úmidos e é efetivo na penetração dos túbulos dentinários e adaptação às paredes dentinárias (Kim et al., 2010). As propriedades biológicas do EndoREZ

têm sido investigadas em torno de sua citotoxicidade (Bouillaguet et al., 2004) e biocompatibilidade tecidual (Louw et al., 2001; Zmener, 2004; Zmener, Pameijer, 2004; Zmener et al., 2005).

O selamento promovido pela obturação endodôntica com os cimentos RoekoSeal, AH Plus e EndoREZ foi avaliado em pré-molares de cães após preparo para pino intra radicular, deixando um remanescente apical de 4 mm, e exposição ao meio bucal por 45 dias. Os cães foram sacrificados e os canais radiculares foram imersos em tinta nanquim e selados por 96 h. Os dentes foram limpos e a infiltração marginal foi medida em estereomicroscopia. O EndoREZ apresentou menores valores de infiltração que o RoekoSeal após a exposição de 45 dias ao meio bucal. Não houve diferença significativa na comparação do AH Plus com os outros cimentos em estudo (Pereira et al., 2007). No ano seguinte, Eldeniz e Orstavik (2009) avaliaram a infiltração bacteriana em dentes obturados com os cimentos RC Sealer, Epiphany, EndoREZ, GuttaFlow, Acroseal, Apexit, AH Plus e RoekoSeal. Os dentes foram contaminados com *Streptococcus mutans* e colocados em câmara contendo caldo. A turvação do caldo foi avaliada todos os dias durante 40 dias. Nenhum dos espécimes do AH Plus, RC Sealer, RoekoSeal e EndoREZ resistiram a infiltração bacteriana por 40 dias, sendo o RC Sealer e o RoekoSeal os cimentos que mais apresentaram infiltração.

A atividade antimicrobiana de um novo cimento endodôntico à base de resina (SuperBond, SB) foi comparada a outros cimentos convencionais: SB Sealer, Sealapex, AH Plus, RoekoSeal, Canals N e MTA (agregado trióxido mineral ProRoot). Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Os microrganismos vivos foram corados e as zonas de inibição de crescimento foram mensuradas. A atividade antimicrobiana do SB foi significativamente menor que dos outros cimentos, exceto em relação ao

MTA. Por outro lado, o AH Plus exibiu a maior atividade antimicrobiana (Yasuda et al., 2008).

Atualmente, é bem aceito o fato que produtos naturais, especialmente àqueles derivados de extratos vegetais ou da fermentação de bactérias, possam produzir medicamentos ou materiais mais biocompatíveis (Sabir et al., 2005; Andrighetti-Fröhner et al., 2006). Entretanto, todo medicamento fitoterápico deve ser testado quanto à sua toxicidade (Maistro et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006).

Com o intuito de obter um cimento com baixa toxicidade, atividade antibacteriana, com preço acessível e de confiabilidade para o cirurgião-dentista, um novo cimento à base de óleo-resina da Copaíba (Biosealer) vem sendo desenvolvido (Bandeira et al., 1999). Este cimento consiste na associação da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio com a ação antiséptica do óxido de zinco e as propriedades do óleo-resina de Copaíba (Garrido et al., 2010).

O óleo-resina da árvore da Copaíba é um produto natural, utilizado pela população amazônica e reconhecido por suas propriedades medicinais. Foi amplamente pesquisado por diversos estudos em outras áreas, como Botânica, Farmacologia, Medicina e Química. Estes estudos relatam que o óleo-resina da Copaíba tem atividade antiinflamatória, antitumoral, antiséptica, ação germicida, antibacteriana e antifúngica (Bruneton, 1987; Lima et al., 2003; Bandeira et al., 2006; Biavatti et al., 2006; Agra et al., 2007; Veiga Jr et al., 2007; Santos et al., 2008; Vasconcelos et al., 2008).

De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Garrido et al. (2010) o Biosealer possui propriedades favoráveis à sua utilização clínica incluindo pouca ou nenhuma irritação tecidual, estimula o processo de reparo e cicatrização, apresenta propriedades antibacteriana, antiinflamatória e cicatrizante; além de cumprir todos os requisitos físico-químicos exigidos pela ADA como tempo de presa, solubilidade, espessura de película, estabilidade dimensional, escoamento e

radiopacidade. Este cimento também tem custo três vezes menor que o Endofill, quatro vezes menor que o Sealer 26, e seis vezes menor que o AH Plus, aumentando o acesso clínico ao material (Garrido et al., 2010). Entretanto, Rosa et al. (2010) verificaram que o Biosealer apresentou alta variação dimensional de expansão.

A atividade antimicrobiana de um cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba foi estudada frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* e *S. sanguis*. Este cimento cuja composição é a associação de óxido de zinco, hidróxido de cálcio e óleo-resina da Copaíba foi comparada aos resultados obtidos por cada um desses componentes isoladamente. Foi verificado que todos os grupos apresentaram atividade antibacteriana e que o óleo-resina da Copaíba apresentou os melhores resultados (Vasconcelos et al., 2008).

2.2 Testes de citotoxicidade

Existem vários métodos para avaliar o comportamento biológico dos cimentos endodônticos. Na Odontologia, conforme estabelecido pela *Fédération Dentaire Internationale* (1980), para análise dos materiais, eles devem ser submetidos primeiramente aos testes iniciais ou primários (*in vitro*), seguidos pelos testes secundários (*in vivo*) e finalizados pelos de aplicação clínica. Os produtos devem ser submetidos aos testes secundários somente nos casos em que obtiveram resultados satisfatórios nos testes primários. A coerência entre os resultados dos testes primários é necessária antes da realização dos testes secundários (Camps et al., 1992).

A toxicidade de um material odontológico pode ser avaliada por testes *in vitro*, experimentais em animais ou por estudos clínicos em humanos (Schmalz, 1994). Os testes *in vitro* são bastante

utilizados para se avaliar a citotoxicidade ou genotoxicidade de um material utilizado em Odontologia. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência de células são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, sendo uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade do que testes executados em animais (Camps, About, 2003; Souza et al., 2006; Lodiene et al., 2008).

Os testes de citotoxicidade podem ser realizados em cultura de células ou em organelas celulares. Para os materiais odontológicos, a técnica em cultura de células é a mais indicada e utilizada; sendo que o contato entre as células e os materiais a serem testados, pode ocorrer de maneira direta ou indireta.

Kim et al. (2007) estudaram a efetividade do método do corante brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. O MTT vem sendo utilizado para testes de citotoxicidade em cultura de células, avaliando o metabolismo mitocondrial das mesmas. Para esses autores este é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis. Da mesma forma, Eldeniz et al. (2007) concordam com a eficácia do MTT na avaliação do metabolismo celular após contato das células com diferentes produtos e consideram este teste simples, rápido e que garante resultados reais.

Assim, Bouillaguet et al. (2004) avaliaram a citotoxicidade do Pulp Canal Sealer, RoekoSeal, Top Seal e EndoREZ pelo teste de MTT em fibroblastos Balb C 3T3. Os cimentos foram preparados e alocados em discos Teflon de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e colocados em contato com meio de cultura na proporção 1,88 cm²/mL (área do disco/volume de meio de cultura). Estes cimentos foram avaliados em tempos de endurecimento 0 h e 24 h, e em três períodos de exposição às células (24 h, 48 h e 1 semana). O Roeko Seal foi o único

material que apresentou baixa citotoxicidade no tempo de endurecimento 0 h. Após 24 h, o RoekoSeal obteve resultados estatisticamente semelhantes ao controle negativo (células sem tratamento). Os outros cimentos apresentaram citotoxicidade maior que o controle negativo em até 60%, e todos se tornaram mais tóxicos conforme maior tempo de exposição ao meio de cultura celular. Utilizando o mesmo teste e as mesmas células, Al-Hiyasat et al. (2010) avaliaram o EndoREZ, AH Plus, Epiphany e Metaseal. Os extratos foram preparados colocando-se 50 mg de cimento em contato com solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 semana. O tempo de exposição dos extratos às células foi de 48 h. Os resultados mostraram que todos os materiais apresentaram citotoxicidade de leve a severa, AH Plus < EndoREZ < Epiphany e MetaSeal.

Lodiene et al. (2008) compararam a toxicidade do AH Plus, EndoREZ, RoekoSeal e Epiphany, utilizando os testes de difusão em filtro e de MTT em fibroblastos L929. Os espécimes dos cimentos foram preparados em anéis de plástico não reativo de 5 mm de diâmetro, e utilizados por contato direto no teste de difusão em filtro Millipore e na forma de extratos (contato indireto) no ensaio de MTT. O teste de difusão em filtro mostrou que o Epiphany e o AH Plus, quando colocados em contato com as células logo após a manipulação dos cimentos (tempo de endurecimento 0 h), mostraram-se severamente tóxicos, enquanto que o RoekoSeal e o EndoREZ mostraram-se não tóxicos. Quando atingiram tempo de endurecimento 24 h, o Epiphany mostrou toxicidade moderada, enquanto que o AH Plus, RoekoSeal e EndoREZ não mostraram toxicidade. No teste de MTT, quando endurecido, o Epiphany mostrou-se severamente mais tóxico que os outros materiais.

Os resultados da toxicidade obtidos para um mesmo teste podem variar para o mesmo cimento de acordo com as condições experimentais devido a utilização de diferentes células, concentração dos

extratos, tempo de endurecimento dos cimentos e de exposição ao meio de cultura e até o tempo de exposição dos extratos às células.

Al-Awadhi et al. em 2004 avaliaram a citotoxicidade do RoekoSeal, Sealapex e Kerr's Pulp Canal Sealer em osteoblastos embrionários de calvário de rato utilizando quatro experimentos: avaliação da formação de nódulos minerais por osteoblastos; determinação da concentração de cada solução experimental resultando em 50% de viabilidade celular (ED_{50}); avaliação da atividade proliferativa dos osteoblastos após 24 h e 72 h de exposição ao ED_{50} de cada cimento; e avaliação da apoptose celular após 24 h e 72 h de exposição ao ED_{50} de cada cimento. Os cimentos foram preparados e colocados em poços da placa de 24 poços numa espessura de 1 a 2 mm, o meio de cultura foi adicionado logo após o preparo dos extratos e três diluições foram obtidas ($190 \text{ mm}^2/\text{mL}$; $190 \text{ mm}^2/500\mu\text{L}$ e $190 \text{ mm}^2/300\mu\text{L}$). Menor atividade apoptótica foi verificada em células expostas ao RoekoSeal do que em células expostas ao Kerr's Pulp Canal Sealer, sugerindo baixa citotoxicidade deste material.

Em 2009, Correa et al. estudaram a citotoxicidade do AH Plus, Fill Canal e L&C expostos a células TPH1 pelo teste de azul de trypan. Os cimentos foram preparados, 0,4 g de cada cimento foi colocado no fundo de uma placa de petri (área do espécime igual a 55 mm^2) e os espécimes foram cobertos com 4 mL de meio de cultura. Os extratos originais e as diluições (10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001%) foram utilizados para a realização do teste. Os resultados mostraram que os extratos originais do AH Plus e do Fill Canal foram severamente tóxicos (90% de morte celular) e que diluições menores que 1% causaram mínima morte celular quando comparado com o grupo controle. L&C causou 36% de morte celular nos extratos originais.

Também, é importante a realização de estudos que utilizem espécimes durante longo período de tempo para observar o comportamento destes materiais longitudinalmente.

Em 2002, Schwarze et al. estudaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos N2, Apexit, RoekoSeal, AH Plus, Ketac Endo, Endometasona e cones de guta-percha em fibroblastos 3T3 e fibroblastos primários de ligamento periodontal humano pelo teste XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide). Vinte e quatro dentes unirradiculados foram preenchidos com estes cimentos e um cone de guta-percha. No grupo controle os dentes foram preenchidos somente com guta-percha. Os dentes ficaram em contato com meio de cultura e a cada semana este meio foi removido para a realização dos testes, durante 1 ano. Nas condições em que o estudo foi realizado somente o N2 apresentou efeitos severos na atividade metabólica das células. Durante as 24 h iniciais todos os cimentos apresentaram alteração no metabolismo celular, porém não foi significativa em relação ao grupo controle.

Susini et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade do Epiphany + cones Resilon, RoekoSeal + cones de guta-percha e Sealite + cones de guta-percha utilizando trinta dentes unirradiculados preenchidos com estes materiais pela técnica da condensação lateral. Os dentes foram mantidos em estufa por 1 dia para o endurecimento dos cimentos. Durante 30 dias os ápices das raízes foram mantidos em contato com 1 mL de meio de cultura, sendo renovado todos os dias para simular as condições do ligamento periodontal. Os meios de cultura removidos após 1, 2, 7 e 30 dias foram expostos a fibroblastos de ratos (L929) e submetidos ao teste de MTT. Os resultados mostraram que após 7 e 30 dias nenhum dos cimentos apresentou citotoxicidade. Após 1 dia, a citotoxicidade dos materiais em ordem decrescente pode ser apresentada: Epiphany + cones Resilon > RoekoSeal + cones de guta-percha > Sealite + cones de guta-percha.

O comportamento biológico de alguns cimentos endodônticos (AH Plus, Pulp Canal Sealer, GuttaFlow, InnoEndo, Real Seal e Epiphany) foram estudados durante 6 semanas. Os espécimes

foram colocados em contato direto com fibroblastos L929 com tempo de exposição às células de 72 h e a atividade mitocondrial foi medida usando o teste de MTT. Os testes foram repetidos depois das 72 h iniciais, 1,3,4 e 6 semanas e entre cada uma os espécimes foram lavados e armazenados em PBS em estufa a 37°C. Os cimentos Pulp Canal Sealer, InnoEndo, Real Seal e Epiphany permaneceram severamente tóxicos durante todo o experimento. O GuttaFlow apresentou-se severamente tóxico até a terceira semana (20% de atividade mitocondrial), porém na terceira semana os resultados estavam semelhantes ao grupo controle. Após a quarta semana a atividade mitocondrial abaixou novamente para 40%. O AH Plus foi severamente tóxico inicialmente, porém a atividade mitocondrial aumentou com o tempo (50% na primeira semana) mantendo este nível durante as seis semanas (Brackett et al., 2008).

Em 2011, Karapinar-Kazandag et al. estudaram a citotoxicidade do AH Plus, EndoREZ, RoekoSeal, Epiphany e Activ GP em fibroblastos L929 e células primárias de polpa humana utilizando o teste MTS (3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4 sulfophenyl)-2H-tetrazólio). Os espécimes foram preparados, colocados em anéis de Teflon (4 mm de diâmetro/ 2 mm de altura), mantidos em estufa até o período de endurecimento fornecido pelo fabricante e colocados em 2,5 mL de meio de cultura por 1, 4 e 7 dias em estufa a 37°C. Para os testes foram utilizados os extratos originais e duas diluições (25% e 50%). Os cimentos Activ GP e Epiphany foram significativamente mais tóxicos que os outros cimentos, porém suas citotoxicidades diminuíram quando os extratos foram diluídos. O Epiphany tornou-se mais tóxico no período de 7 dias. Nenhuma ou mínima toxicidade foi observada com o RoekoSeal, AH Plus e EndoREZ.

Quatro cimentos endodônticos à base de resina metacrilato, EndoREZ, RealSeal, MetaSEAL e RealSeal SE foram submetidos ao teste de MTT. Os cimentos foram preparados e colocados sobre discos Teflon (3 mm de espessura x 5 mm de diâmetro). Após a

polimerização dos cimentos, eles foram colocados em contato com células de osteossarcoma de rato (ROS 17/2.8) e meio de cultura na proporção área/volume de 150 mm²/mL. Os testes foram realizados após o período de 72 h, e então por cinco semanas sucessivas. Após cada teste os espécimes foram removidos, lavados e imersos em solução simulada de fluido corporal (SBF). Inicialmente, todos os cimentos exibiram severa toxicidade. Após 5 ciclos de imersão em SBF, os cimentos EndoREZ e RealSeal permaneceram severamente tóxicos. Com o passar do tempo a toxicidade do MetaSEAL e do RealSeal SE diminuíram gradualmente. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou variados graus de injúria celular refletindo a toxicidade do RealSeal SE e células com mitocôndria intacta foram identificadas após o cimento se tornar não tóxico, na 5ª semana (Ames et al., 2009).

2.3 Testes de genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade e citotoxicidade formam uma importante parte da pesquisa do câncer e da avaliação de risco de carcinógenos potenciais em materiais odontológicos (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2005). Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* e são designados para detectar componentes que induzem danos ao material genético das células tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Ribeiro et al., 2006). Nas últimas décadas, ensaios de genotoxicidade têm alcançado ampla aceitação como um importante indicador carcinogênico. Entretanto, a genotoxicidade de cimentos endodônticos tem sido pouco estudada sobre células eucarióticas (Geurtsen, 2001; Tai et al., 2002; Camargo et al., 2009).

Embora existam muitos testes de genotoxicidade *in vitro*, os mais utilizados são o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2006) e o teste de micronúcleo (MNT) (Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

Recentemente o teste de micronúcleo *in vitro* tem se tornado um método atrativo para os testes de genotoxicidade devido à sua simplicidade de aplicação e obtenção de dados em diferentes tipos celulares. É interessante considerar que o teste de micronúcleo *in vitro* pode representar uma importante alternativa para os testes *in vivo* de medula óssea (Decordier, Kirsch-Volders, 2006). Além disso, o MNT *in vitro* é capaz de detectar aberrações ou mutações cromossômicas e também de agentes clastogênicos e aneugênicos, porque fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular normal (Schweikl e Schmalz, 2000).

Camargo et al. (2009b) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de materiais de capeamento pulpar: cimento de hidróxido de cálcio Dycal (HC), MTA branco, MTA cinza e Polímero derivado do óleo da mamona (POM) em duas linhagens celulares: células pulpares humanas transformadas (tHPC) submetidas aos testes de cristal violeta e de produção de ROS (mensuração dos níveis de espécie reativas de oxigênio), e fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79) submetidos ao MNT e análise do ciclo celular. Concluíram que o POM, o MTA branco e o MTA cinza não apresentaram citotoxicidade e não induziram produção de ROS sobre as células tHPC, diferentemente do HC. Todos os materiais estudados não foram genotóxicos sobre as células V79.

Em outro estudo os aspectos toxicológicos do Acroseal, Epiphany, AH Plus e Polímero do óleo da mamona (POM) foram analisados pelos testes de citotoxicidade e de produção de ROS sobre células de polpa humana e pelos testes de micronúcleo e análise do ciclo celular sobre as células V79. Quando comparado aos outros cimentos o

POM não mostrou citotoxicidade. O Acroseal foi o material mais citotóxico e genotóxico, porém o Epiphany promoveu maior produção de ROS. O AH Plus foi citotóxico apenas em seu extrato original, perdendo fortemente sua toxicidade após a primeira diluição. Os cimentos Acroseal, Epiphany e AH Plus foram capazes de induzir a formação de micronúcleos e o Acroseal retardou o ciclo celular na fase G2 (Camargo et al., 2009a).

Cavalcanti et al. (2006) estudaram a genotoxicidade do ácido kaurenóico presente no óleo da Copaíba em células V79 pela utilização dos testes cometa e MNT. Foram testadas as concentrações de 2,5; 5; 10; 30; e 60 µg/mL com tempo de exposição as células de 3 h. Os resultados mostraram que o ácido kaurenóico apresentou danos ao DNA nas condições em que o estudo foi realizado.

A genotoxicidade dos componentes endodônticos antimicrobianos formocresol, paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio e clorexidina foi avaliada utilizando-se o teste cometa sobre células de ovário de hamster Chinês (CHO). Uma quantidade de 10 µL de cada substância foi colocado em contato com as células. O hidróxido de cálcio foi ajustado a concentração de 100µg/mL e a solução de digluconato de clorexidina 20% foi diluída em solução salina em concentrações de 0,01% à 1%. Os resultados mostraram que nenhum dos componentes estudados mostrou danos ao DNA das células (CHO) (Ribeiro, et al. 2005).

Miletic et al. (2003) compararam o AH 26 e o AH Plus quanto a citotoxicidade e genotoxicidade em células V79. Para a análise da citotoxicidade, os extratos dos cimentos foram preparados em diluições de DMSO e as culturas marcadas pela coloração com corante Nigrosin nos períodos de 1 h, 24 h e 7 dias. Já, a genotoxicidade dos cimentos foi avaliada pela formação de micronúcleos em linfócitos humanos. Ambos os cimentos apresentaram citotoxicidade similar em altas concentrações, entretanto, não induziram aberrações cromossômicas ou indução de formação de micronúcleos anormais em

nenhum período experimental. Porém, em outro estudo, estes mesmos cimentos, também diluídos em DMSO, apresentaram-se citotóxicos e genotóxicos quando submetidos aos testes de MTT e cometa, respectivamente (Huang et al., 2002). Indicando que dependendo do tipo de teste realizado e do tipo de célula utilizada os resultados podem ser diferentes.

Schweikl e Schmalz (2000) verificaram a citotoxicidade e a genotoxicidade do cimento AH Plus e de seus componentes (pasta A e pasta B) por meio da indução de micronúcleo em células V79. O AH Plus foi testado imediatamente após a manipulação e depois de 24 h do tempo de presa. Os materiais foram diluídos em DMSO e solução salina fisiológica por 24 h. As pastas A e B diluídas em DMSO reduziram a viabilidade das células V79, sendo que os números de micronúcleos foram sete vezes maiores em culturas de células tratadas comparadas ao controle não tratado. Após 24 h, nenhuma genotoxicidade foi observada no AH Plus diluído com DMSO ou solução salina fisiológica. No entanto, os autores evidenciaram a indução de mutações cromossômicas do AH Plus imediatamente após a manipulação.

Ainda Tai et al. (2002) examinaram o potencial genotóxico de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e resinosos sobre células eucarióticas. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos de quatro cimentos endodônticos (Canals, N2, AH26 e AH Plus) foram avaliados pelo ensaio de MTT, ensaio de precipitação do DNA e análise da fragmentação do DNA sobre culturas de fibroblastos V79. Os resultados mostraram que todos os cimentos foram citotóxicos às células V79. A toxicidade decresceu na ordem N2 > AH26 > AH Plus > Canals. Em adição, N2, AH26 e AH Plus exibiram genotoxicidade pela quebra de cadeias simples de DNA e digestão do DNA genômico. Entretanto, N2 foi o cimento mais tóxico entre os cimentos testados. Estes achados sugerem que os cimentos mostraram diferentes efeitos tóxicos dependendo do tipo e dos componentes. Os cimentos endodônticos

contendo bisfenol A e formaldeído em sua composição, provaram ser não somente citotóxicos, mas também genotóxicos.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo propôs avaliar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxicos por ensaio de MTT e genotóxicos pelo teste de formação de micronúcleos em extratos de cimentos endodônticos sobre cultura de fibroblastos de hamster Chinês (V79).

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo A).

4.1 Cultivo das células

Foram utilizados fibroblastos de hamster Chinês (V79) obtidos do Banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ. As células foram cultivadas em meio de cultura composto por meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e solução de penicilina (10000 U.I./mL) e estreptomicina (10mg/mL) a 1% (Cultilab Ltda, Campinas - SP, Brasil) (Figura 1). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo celular de 75 cm³ – 270 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) e após apresentar 80% de confluência da camada de células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato - PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e destacadas com auxílio de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 1). Em seguida, essas células foram semeadas em dois novos frascos de cultivo de 75 cm³. Após atingirem a quantidade de células suficiente para a realização do plaqueamento, as células foram semeadas em placas com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde receberam os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.



Figura 1 - Meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco médio para cultura de célula (garrafa 75 cm³ – 270 mL) foram pipetados 10 mL de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. O meio de cultura, além de servir como nutrição para as células, também serve para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância na qual a célula é congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. No livro de

registros do banco de células do laboratório de cultura de células da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/SP – UNESP foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) (Figura 2a) que continham as células desejadas. Um tubo criogênico (TPP, Trasadingen, Suíça) (Figura 2b) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento do conteúdo contido no mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no frasco de cultura de células contendo meio de cultura (Figura 2c).

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica Leitz, Germany) para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).



Figura 2 - a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) coleta das células V79 do tubo criogênico; c) inserção das células na garrafa de cultivo celular.

4.1.2 Troca de meio

O meio de cultura foi trocado apenas quando não houve crescimento celular suficiente para a realização da subcultura. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio de luz invertida (Leica, Germany). O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco e levado novamente à estufa.

4.1.3 Subcultura

A subcultura foi realizada quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) (Figura 3a). Desta forma, as células foram passadas de um frasco para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. As células foram lavadas com 5 mL de PBS, que foi aspirado em seguida e, então, foi adicionado ao frasco 3 mL de tripsina, utilizada para destacar as células. O frasco com tripsina foi levado à estufa onde permaneceu por 5 min e em seguida foram realizadas leves batidas no fundo do frasco, para auxiliar na remoção destas. Estando as células prontas, foram adicionados 6 mL de meio de cultura sobre elas, neutralizando a tripsina.

Todo o conteúdo foi colocado em um tubo falcon (TPP, Trasadingen, Suíça) e, então, levado à centrífuga (Quimis Aparelhos Científicos, Brasil) por 5 min a 1000 rpm para a formação de um precipitado de células, chamado de *pelet*.

O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura fresco, estando bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 10 mL de meio de cultura, preparados previamente (Figura 3b). Os frascos foram levados novamente à estufa onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

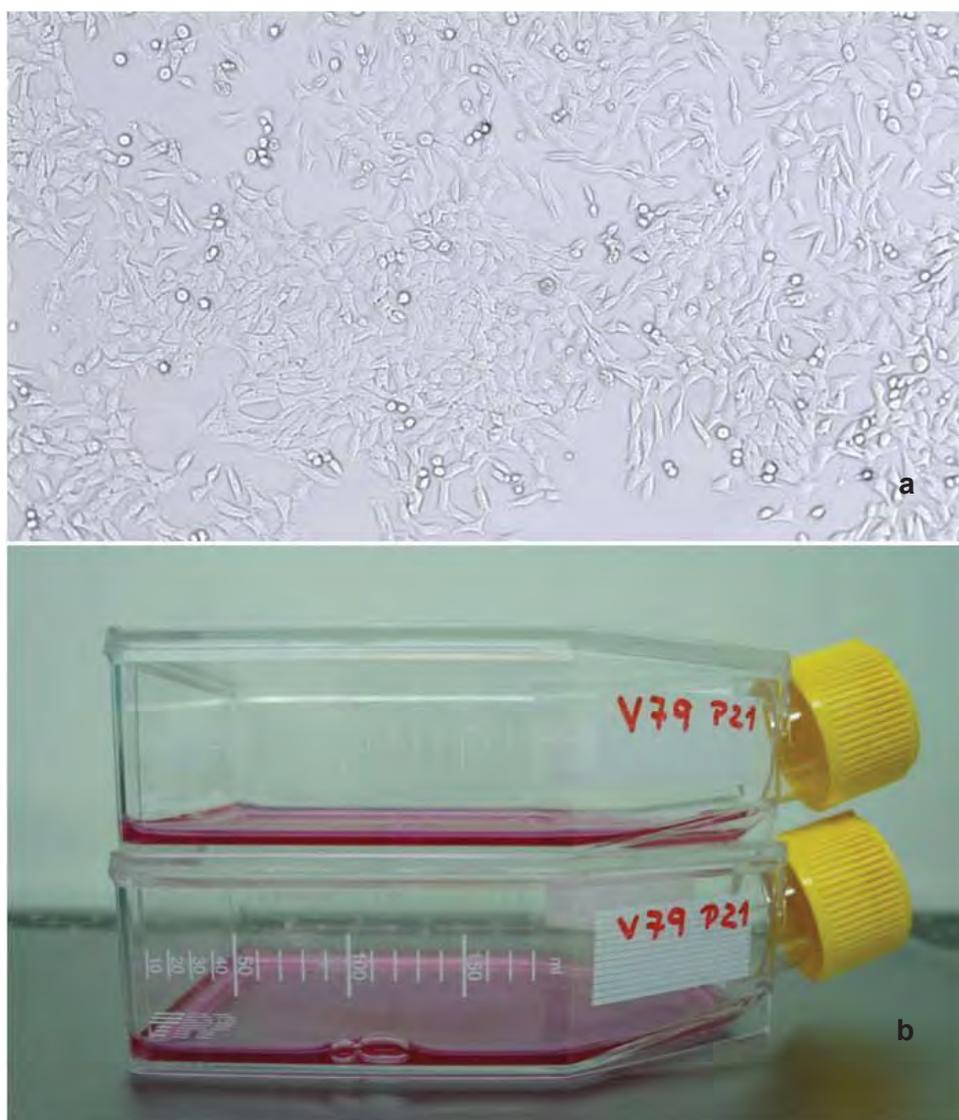


Figura 3 – a) imagem microscópica (40x) indicando 80% de confluência das células V79; b) garrafas de cultivo celular para a realização da subcultura.

4.1.4 Contagem de células

A contagem de células (Figura 4a) foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas de 96 poços. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet* (Figura 4b); sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura fresco. Dessa suspensão foram retirados 10 μ L os quais foram levados à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany) (Figura 4c), que foi levada ao microscópio invertido de luz para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos.

Para obtenção da quantidade de células por mL, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\mathbf{C \times 10^4 = n^\circ \text{ células/mL}}$$

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos.

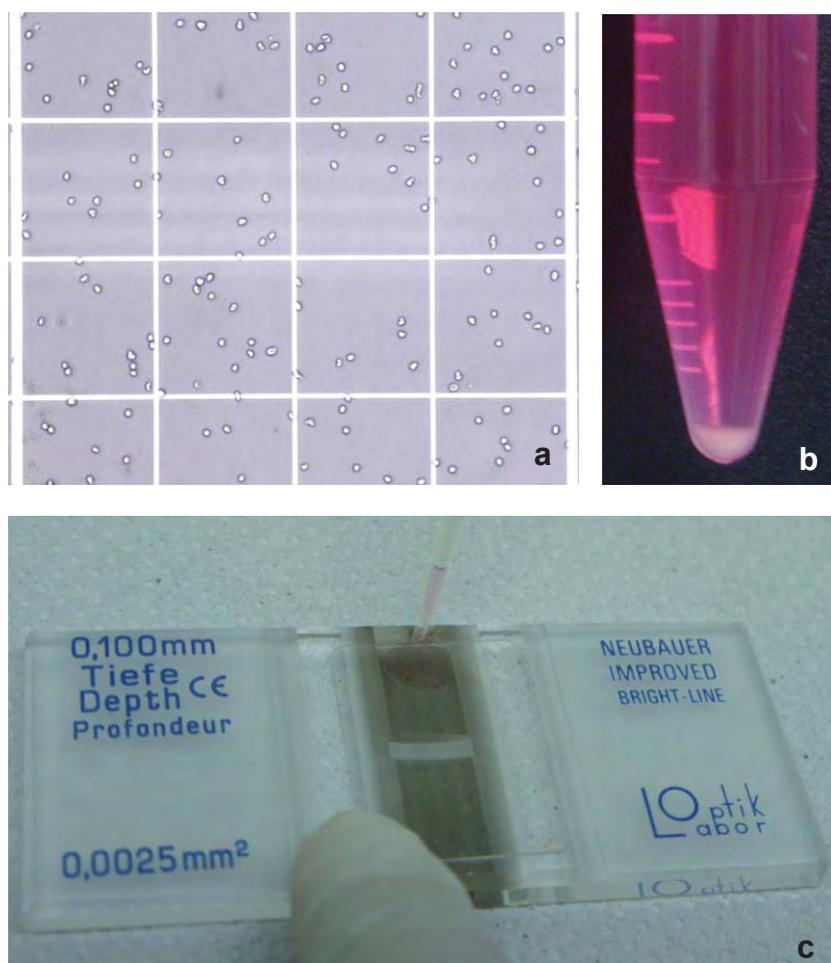


Figura 4 – a) imagem microscópica (40x) das células V79 em um quadrante da câmara de Neubauer; b) *pellet*; c) suspensão celular sendo inserido na câmara de Neubauer.

4.2 Plaqueamento

Foi utilizada 1 placa de 96 poços para cada cimento avaliado. Em cada placa, foram utilizados quatro espécimes (poços) para o extrato original, as diluições e os grupos controles negativo com e sem células (Figura 5). As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 24 h, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes para cada grupo experimental.



Figura 5 – Plaqueamento da suspensão celular em placa de 96 poços (5×10^3 células/poço). BCO) sem células; CN) com células; 1:1 - 1:32) diluições.

4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação das células cultivadas em placas de 96 poços sem aplicação dos tratamentos em teste. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT nos períodos de 6, 12 e 24 h.

4.4 Preparação dos extratos originais e diluições

Para o ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade a resposta de fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79) frente aos cimentos endodônticos foi analisada e para isso foram estabelecidos

quatro grupos: AHPlus (Dentsply De Trey, Alemanha); EndoREZ (Ultradent, USA); RoekoSeal (Coltene Whaledent, Alemanha) e cimento experimental à base do óleo-resina da Copaíba (Biosealer). As composições destes materiais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição dos cimentos endodônticos utilizados nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade

Cimentos endodônticos	Composição
AH Plus (Dentsply De Trey, Alemanha)	Pasta A: Bisphenol-A, Bisphenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro Pasta B: dibenzylidiamina, aminoadamantane, diamina tricyclodecane, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone
EndoREZ (Ultradent, USA)	30% UDMA, óxido de zinco, sulfato de bário, resinas, pigmentos
RoekoSeal (Coltene Whaledent, Alemanha)	Polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óleo à base de parafina, catalisador de platina, dióxido de zircônio
Biosealer (cimento experimental à base do óleo-resina da Copaíba)	Pó: óxido de zinco, hidróxido de cálcio, subcarbonato de bismuto, resina natural (breu), bórax Líquido: óleo-resina da Copaíba

Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante sob condições assépticas em capela de fluxo laminar para prevenir risco de contaminação bacteriana durante os testes de toxicidade. Os materiais foram acondicionados em poços da placa de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) de modo que o cimento ocupasse a área total do fundo do poço, de diâmetro 16,2 mm, e apresentasse 2 mm de altura. Para esta padronização, 0,22 mL de cimento foi colocado em cada poço com o auxílio de uma seringa de 1 mL (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA). Os espécimes do cimento EndoREZ foram cobertos com parafilme e fotopolimerizados (780 mW/cm²) por 40 s. Os cimentos foram deixados em estufa a 37°C por 12h para que ocorresse o endurecimento dos mesmos (Figura 6a).

Em seguida, os poços com cimentos foram preenchidos com 2,5 mL de meio de cultura e as placas permaneceram em estufa a 37°C por 24 h. Os extratos originais (1:1) foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993 em uma proporção de 82,4 mm² da área da superfície do espécime por mL de meio de cultura.

Após este período, 2 mL do meio que estavam em contato com os cimentos foram removidos de cada poço (Figura 6b) e colocados em tubo falcon formando os extratos originais (1:1) de cada material e congelados a temperatura de -80°C.

Para a realização das diluições, os extratos originais foram descongelados em temperatura ambiente. Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados 2 mL de extrato original e para o ensaio de micronúcleo foram utilizados 8 mL. Para cada extrato original foram realizadas cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), onde metade da quantidade do extrato original foi diluído em mesma quantidade de meio de cultura contido em tubo falcon, formando a diluição 1:2. As diluições seguintes foram realizadas da mesma forma, metade da quantidade da diluição 1:2 foi diluída em mesma quantidade de meio de cultura para formar 1:4, e assim por diante até o preparo da diluição 1:32 (Figura 7).

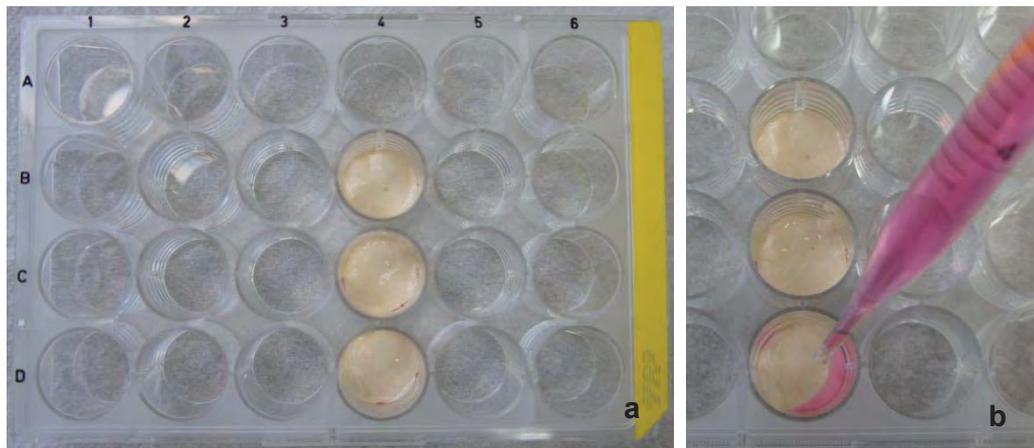


Figura 6 – a) espécimes do cimento RoekoSeal na placa de 24 poços; b) remoção de 2 mL de extratos de cada poço da placa de 24poços.

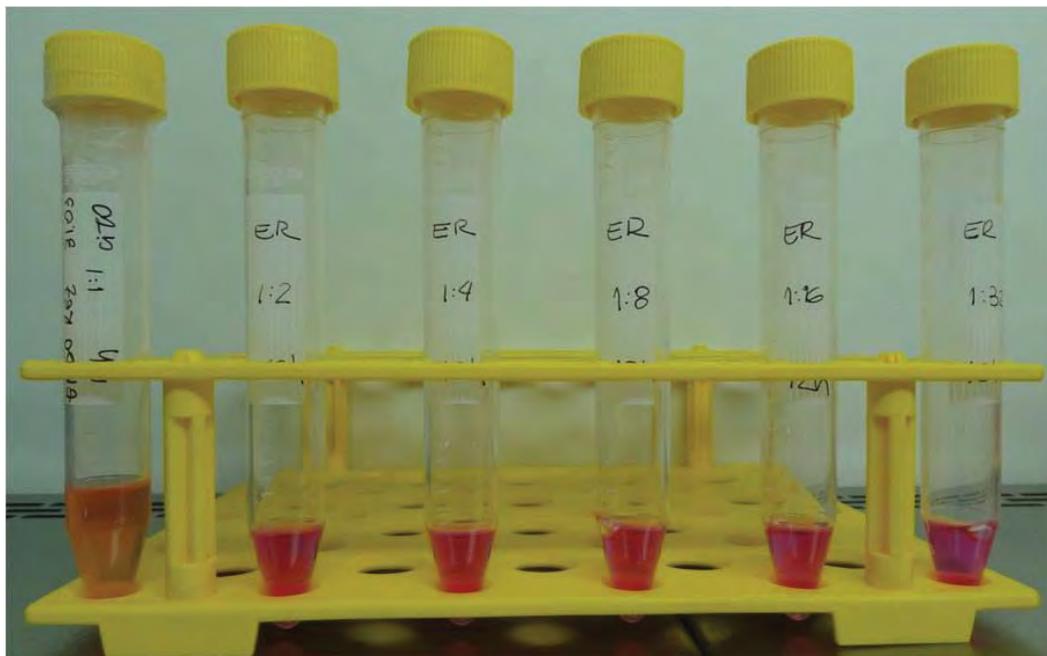


Figura 7 – Extrato original (1:1) e suas diluições (1:2; 1:4;1:8; 1:16 e 1:32) do cimento Endo REZ.

4.5 Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, os extratos originais e suas diluições foram colocados em contato com fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79).

Para o plaqueamento foi utilizada uma quantidade de 5×10^3 células, determinada pelo levantamento da curva padrão, em 200 μL de meio de cultura, acondicionado em cada poço da placa de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Após este período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas a 200 μL de diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) e dos extratos originais (1:1) dos materiais; 200 μL de meio de cultura para o controle negativo (sem células - Branco) e 200 μL de meio para o controle negativo (com células - CN) e incubadas em estufa com 5% CO_2 a 37°C por 24 h.

Após este período, a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT.

O ensaio com MTT foi realizado com o preparo do reagente, diluindo-se 0,5 mg de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) (Figura 8a) em 1 mL de solução de PBS. Como essa solução é sensível a

luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 μ L da solução de MTT foram adicionados em cada poço. Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu na estufa por uma hora. Após este período, o MTT foi removido e foram adicionados 100 μ l de DMSO (Figura 8c) em cada poço, permanecendo na estufa por 10 min. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 min e as placas foram levadas à leitora (Asys Hitech GmbH, Áustria) previamente programada (Figura 8b). A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância foram submetidos à análise quanto à porcentagem de viabilidade celular pela atividade mitocondrial das células e foi feita uma comparação quanto à viabilidade celular após a aplicação de cada controle.

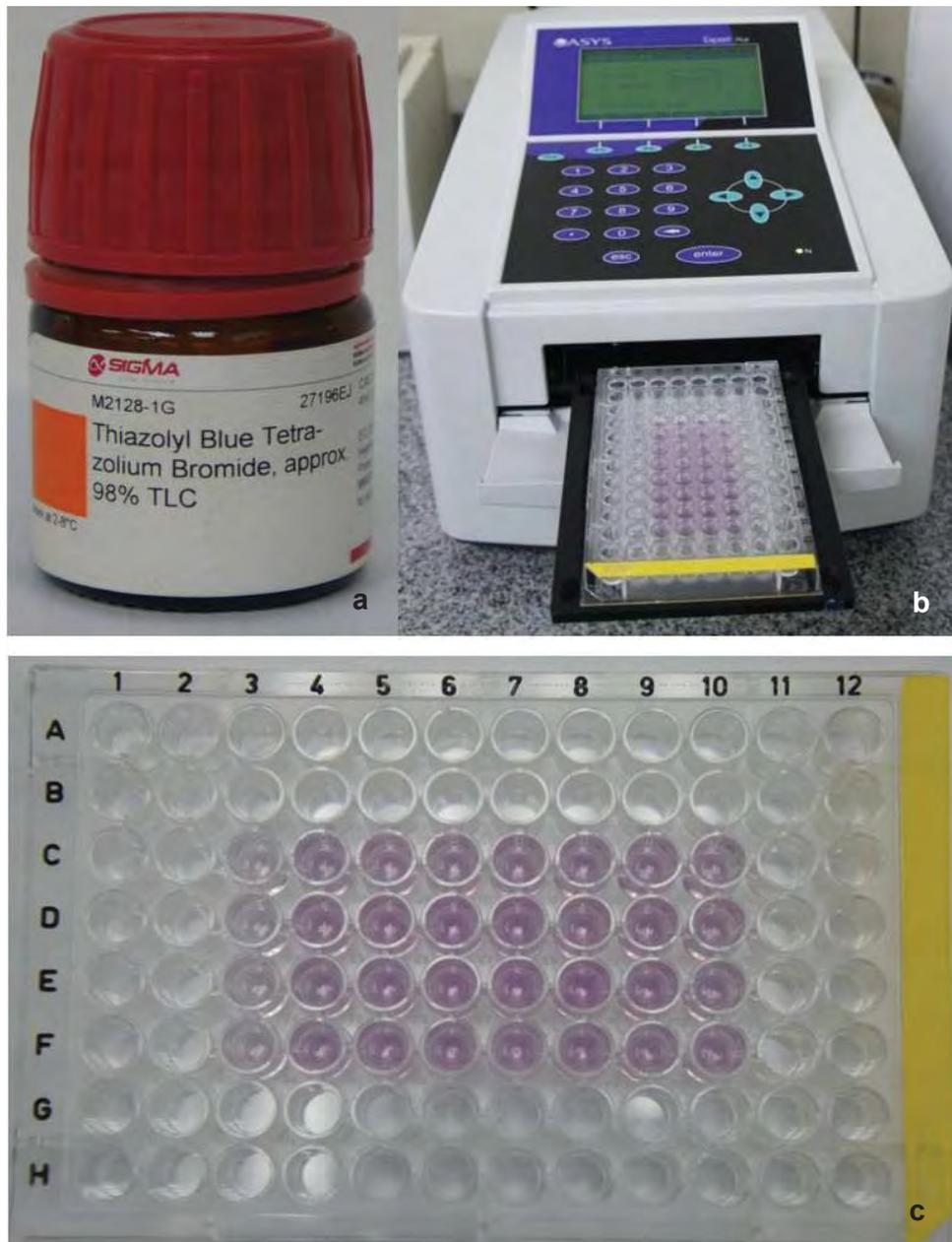


Figura 8 – a) frasco de MTT; b) espectrofotômetro 570 nm utilizado para leitura da placa; c) placa de 96 poços após aplicação de DMSO.

4.6 Ensaio de micronúcleo *in vitro*

Para o ensaio de micronúcleo (MNT), os extratos originais dos cimentos endodônticos e suas diluições foram colocados em contato

com fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79). Foram utilizadas as diluições que obtiveram viabilidade celular próxima a 50%, determinada pelo ensaio de MTT (Tabela 1). As diluições mais citotóxicas foram descartadas, pois não permitiram proliferação celular ou causaram apoptose das células existentes não sendo possível realizar contagem de micronúcleos e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos (Figura 12 e 13). Meio de cultura celular e etilmetano sulfanato (EMS) (Sigma Aldrich Co. Alemanha) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

Uma suspensão celular de densidade de 3×10^5 células e 4 mL de meio de cultura foram colocadas em lâminas de vidro estéreis as quais foram previamente colocadas em placas retangulares de área de $9,4 \text{ cm}^2$ (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA) (Figura 9) e deixadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 . Após o cultivo, as células foram tratadas com 4 mL das diluições seriadas expostas a várias concentrações (diluições) dos cimentos endodônticos, ao meio de cultura celular (controle negativo) e à concentração de 5 mM de etilmetano sulfanato (EMS) (controle positivo) por 24 h.

Para o EndoRez foram utilizadas as diluições 1:8 e 1:16, para o AH Plus foram utilizadas as diluições 1:8 e 1:16, para o RoekoSeal foram utilizados o extrato original (1:1) e a diluição 1:2 e para o cimento experimental à base de óleo resina da Copaíba as diluições 1:2 e 1:4. O grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura e o grupo controle positivo foi tratado com EMS na concentração de 5 mM (Tabela 1).

Após 24 h, as placas foram retiradas da estufa, as soluções foram removidas dos poços e as placas foram lavadas com 3 mL de PBS e as células foram fixadas em 4 mL de álcool absoluto 100% por 30 min. Após este período, as lâminas foram removidas dos poços e deixadas em temperatura ambiente para a secagem por 24 h.

As lâminas foram colocadas em uma caixa de vidro para a coloração das células. Para isso, as lâminas foram colocadas em uma

solução de 5 N HCl (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) por 40 min, lavadas com água destilada e coradas com corante SCHIFF (Sigma Aldrich Co., Alemanha) por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em água sulfurada por 6 min (208 mL de água destilada, 10 mL de 10% $K_2S_2O_5$ (Sigma Aldrich Co., Alemanha) e 2 mL de 5 N HCl) e em água corrente por 10 min. Após, as células foram desidratadas em diluições seriadas de alcoóis (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) por 5 min cada. As lâminas, então, foram deixadas por 10 min em xilol (Chemco, Hortolândia, São Paulo, Barsil) e montadas com lamínulas com Entellan (EasyPath, São Paulo, São Paulo, Brasil).

Tabela 1 - Tratamento das culturas celulares com diluições selecionadas para cada material e grupos controles.

Materiais	Diluições	
Controle negativo	Meio de cultura	
Controle positivo (EMS)	5mM	
AH Plus	1:8	1:16
EndoRez	1:8	1:16
RoekoSeal	1:1	1:2
Copaíba	1:2	1:4

Os micronúcleos foram analisados em microscópio com objetiva de imersão (100X) (Leica Leitz, Germany), sendo que foram avaliadas 1000 células/lâmina para cada diluição em experimentos independentes. Pelo menos quatro lâminas derivadas de dois experimentos independentes foram analisadas.

Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menor que

1/3 da área do núcleo principal. Somente as células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose e que exibiram fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.



Figura 9 – Placa retangular com lâmina de vidro estéril para cultivo celular utilizado no teste de MNT.

4.7 Análise Estatística

Os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$) (MINITAB - Minitab, version 15, 2009 e STATISTIX for Windows - version 8.0, StatSoft Inc, 2000) foram utilizados para as análises estatísticas das diferenças entre a sobrevivência celular, em culturas de células tratadas e não tratadas e para verificar a diferença na quantidade de micronúcleos de pelo menos quatro lâminas derivadas de dois experimentos independentes.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade quanto a sobrevivência celular estão descritos na Figura 10 e Tabelas 2 e 3. As porcentagens de células sobreviventes de todos os materiais comparados ao grupo controle são mostradas na Tabela 2.

A citotoxicidade dos extratos dos cimentos endodônticos foi determinada nas células V79 após um período de exposição de 24h utilizando-se o teste de MTT. Quase todos os materiais testados foram citotóxicos exceto o cimento RoekoSeal, contudo os efeitos variaram imensamente entre as diferentes diluições. As porcentagens de células viáveis, diante das diferentes diluições dos materiais após os testes, estão expressas na Tabela 2 e Figura 10.

O cimento EndoREZ foi o mais tóxico dos materiais testados, reduzindo a sobrevivência celular a 1,09% no extrato original, 23,54% na diluição 1:4, 41,95% na diluição 1:8 e 75,59% na diluição 1:32. Na seqüência, o cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba reduziu a sobrevivência celular a 0,69% nos extratos originais e 60,41% na diluição 1:2. O cimento AH Plus reduziu a sobrevivência celular para 5,75% nos extratos originais e 61,89% na diluição 1:2. Finalizando com o RoekoSeal que promoveu os melhores resultados exibindo 101,41% de sobrevivência celular nos extratos originais.

Tabela 2 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre V79, expressado em porcentagem de células viáveis. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil.

Diluições	AH PUS	ENDOREZ	COPAÍBA	ROEKOSEAL
controle	100	100	100	100
1:32	112,63 (101,2 - 154,3)	75,59 (61,5 - 83,8)	111,39 (103,4 - 153,2)	102,92 (88,4 - 123,8)
1:16	108,50 (84,5 - 163,4)	59,00 (52,9 - 64,2)	102,14 (95,1 - 120,0)	102,33 (94,9 - 105,8)
1:8	103,58 (78,0 - 127,3)	41,95 (37,9 - 50,2)	106,7 (94,5 - 233,7)	98,57 (90,3 - 109,2)
1:4	94,48 (84,8 - 107,1)	23,54 (21,6 - 23,5)	89,60 (85,1 - 154,5)	101,97 (97,5 - 106,9)
1:2	61,89 (41,2 - 77,4)	0,72 (0,5 - 1,1)	60,41 (57,0 - 64,3)	101,25 (95,7 - 114,6)
1:1	5,75 (2,5 - 8,8)	1,09 (0,8 - 1,1)	0,69 (0,3 - 0,9)	101,41 (92,8 - 108,2)

% de sobrevivência celular: Mediana (25% - 75% percentil)

Tabela 3 – Dunn (5%) para as diluições de todos os materiais.

Materiais	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AH Plus	A B	B	A B	A	A	A
EndoREZ	B C	C	C	B	B	B
Copaíba	C	B	B	A	A	A
RoekoSeal	A	A	A	A	A	A

* Letras iguais significam ausência de diferença estatisticamente significante, letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

As diferenças estatísticas entre os materiais nas diferentes diluições estão expressas na Tabela 3. A influência dos extratos dos materiais na sobrevivência celular pode ser classificada da maior toxicidade para a menor seguindo: EndoREZ > Copaíba ≥ AH Plus > RoekoSeal, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

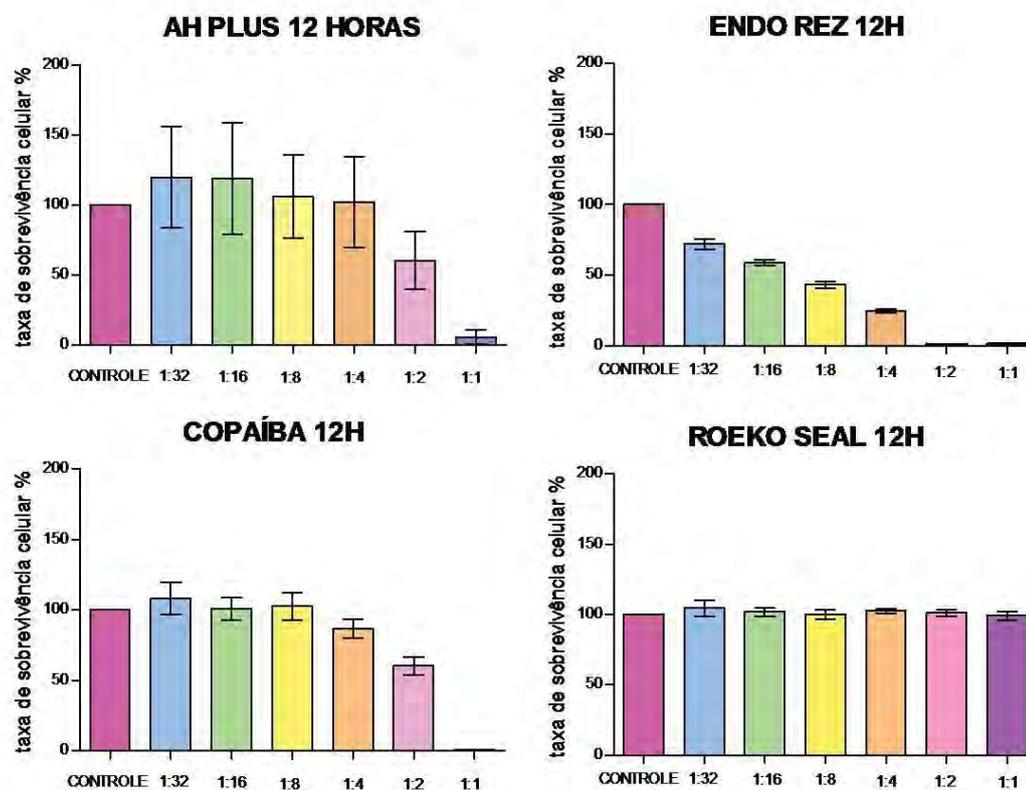


Figura 10 - Citotoxicidade dos materiais em V79 após a exposição às diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As células foram expostas por 24 h, e a taxa de sobrevivência celular foi observada em quatro experimentos independentes. As barras representam as medianas (25-75% percentil) calculadas em histogramas individuais.

5.2 Teste de micronúcleo (MNT)

A formação de micronúcleos pelos materiais endodônticos testados foi analisada em cultura de células V79. Os micronúcleos foram identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal e compreendendo menos de 1/3 da área do núcleo (Figura 11). Apenas células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose e aquelas exibindo fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

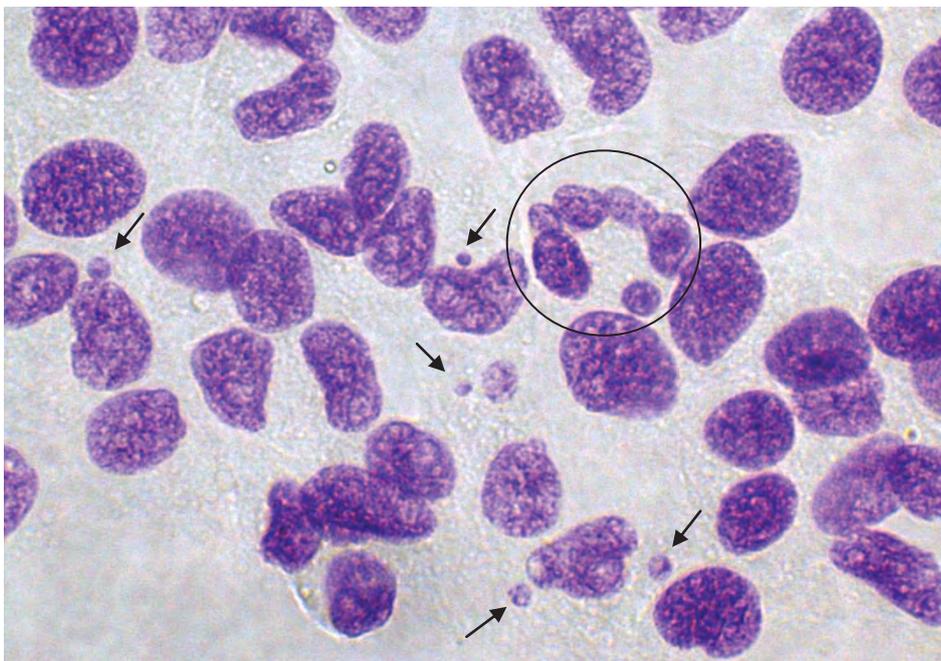


Figura 11 – Formação de micronúcleos em células V79 após o tratamento com EndoREZ na diluição 1:8; seta indica micronúcleo de células contadas e círculo indica célula com mais de 5 micronúcleos não contada (aumento 100X).

Foram utilizadas as diluições que obtiveram viabilidade celular próxima a 50%, determinada pelo ensaio de MTT (Tabela 1). As diluições mais citotóxicas foram descartadas, pois não permitiram proliferação celular ou causaram apoptose das células existentes não

sendo possível realizar contagem de micronúcleos e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos (Figura 12 e 13).

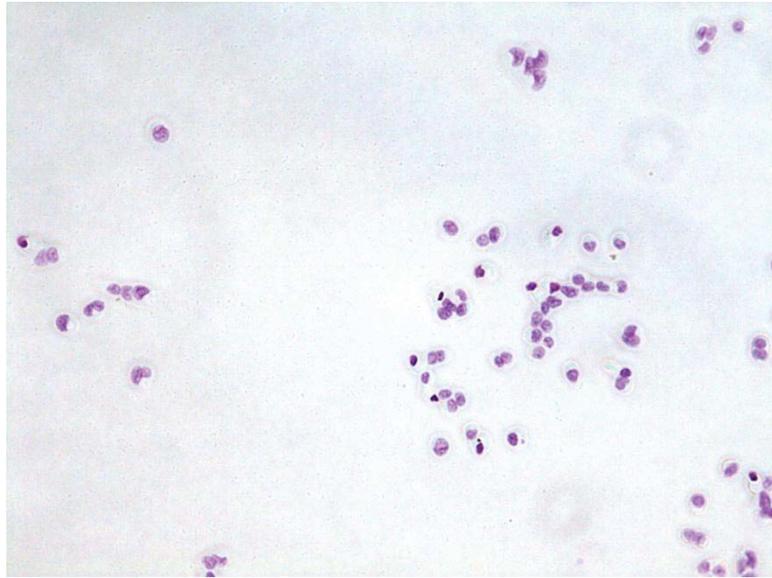


Figura 12 – Imagem de células V79 após o tratamento com EndoREZ na diluição 1:4 mostrando pouca atividade proliferativa das células e células apoptóticas (aumento 20X).

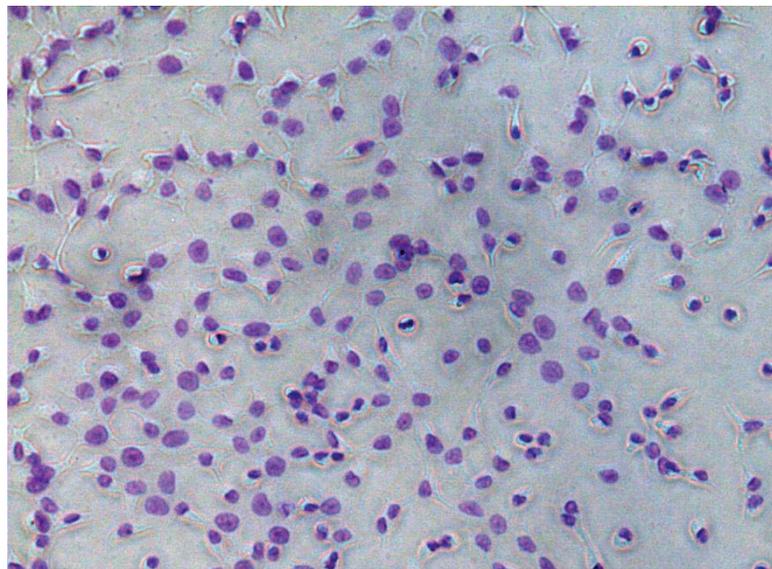


Figura 13 – Imagem de células V79 após o tratamento com AH Plus na diluição 1:8 mostrando atividade proliferativa das células (aumento 20X).

O EMS, utilizado como grupo controle positivo, foi capaz de aumentar o número de micronúcleos em aproximadamente 10 vezes em relação ao grupo controle negativo. Verificou-se, também, que o EndoREZ na diluição 1:8 foi capaz de aumentar o número de micronúcleos em aproximadamente 14 vezes e na diluição 1:16 aumentou em quase 3 vezes em relação ao grupo controle negativo. Em relação ao controle positivo a diluição 1:8 do EndoREZ formou 1,37 vezes mais micronúcleos para cada 1000 células (Figura 14 e Tabela 4).

Os materiais AH Plus, Copaíba e RoekoSeal não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo controle negativo, não apresentando efeito genotóxico (Figura 14 e Tabela 4).

Tabela 4 - Formação de micronúcleos pelo contato das culturas celulares com extratos dos materiais sobre as células V79, expressos em micronúcleos por 1000 células, indicando os valores das médias e os percentuais 25% e 75%.

Materiais	Mediana	25%	75%
Controle	8,5	7,0	10,0
RoekoSeal 1:1	10,0	8,0	12,0
RoekoSeal 1:2	6,5	6,0	7,0
EndoREZ 1:8	124,5	116,0	133,0
EndoREZ 1:16	23,0	22,0	24,0
AH Plus 1:8	10,0	9,0	11,0
AH Plus 1:16	10,0	9,0	11,0
Copaíba 1:2	10,5	9,0	12,0
Copaíba 1:4	9,0	5,0	13,0
EMS	91,0	84,0	98,0

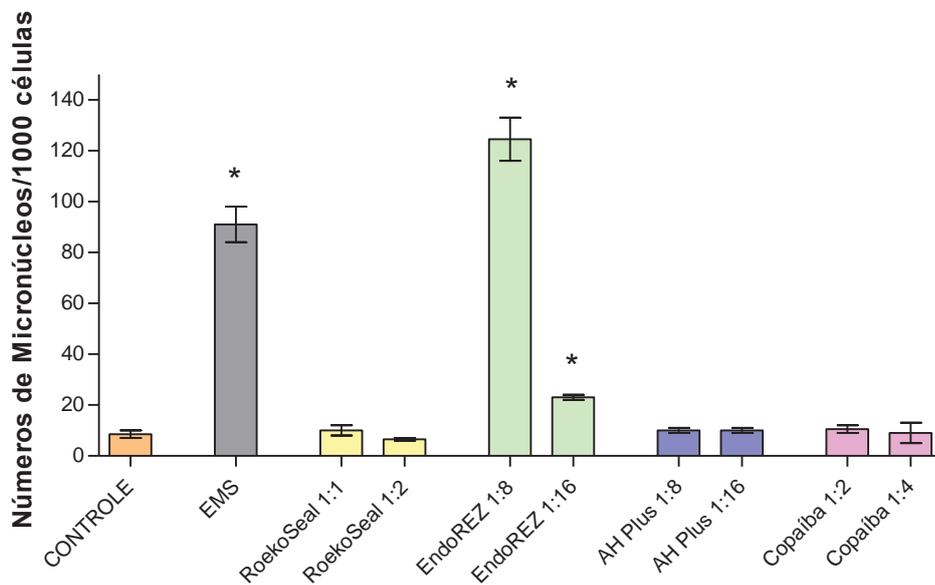


Figura 14 - Indução de micronúcleos em células V79 após a exposição aos materiais em diferentes diluições. Os extratos originais (1:1) foram serialmente diluídos com meio de cultura celular como indicado. As barras representam as medianas (25-75% percentil) e as medianas dos números de micronúcleos foram calculadas em relação ao grupo controle negativo. Diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle negativo e os grupos tratados são indicadas com asteriscos.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da Metodologia

O bom comportamento biológico dos cimentos endodônticos tem grande importância na terapia endodôntica. A resposta biológica molecular depende das interações que resultam na interface criada quando o material é colocado em contato com o organismo (Bouillaguet et al., 2006). Um cimento endodôntico biocompatível não deve atrasar ou mesmo impedir o processo de reparo tecidual.

Para assegurar a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos, vários métodos de pesquisa têm sido usados para avaliar seu comportamento biológico. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência de células são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, sendo uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade do que um teste executado em animais (Camps, About, 2003; Souza et al., 2006) e ainda permitem avaliar os complexos mecanismos homeostáticos que ocorrem *in vivo* (Ribeiro et al., 2005). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagens a facilidade no controle dos fatores experimentais que são frequentemente um problema em experimentos *in vivo* (Hensten-Pettersen, 1988; Scelza et al., 2001; Camps, About 2003). Entretanto, é extremamente importante combinar os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* para entender os efeitos dos cimentos endodônticos nos tecidos apicais.

Neste estudo foram utilizados dois experimentos *in vitro*, sobre um modelo de cultivo celular, que constitui testes iniciais para a

avaliação de materiais empregados na Odontologia. A citotoxicidade e a genotoxicidade foram avaliadas em fibroblastos de hamster Chinês (V79) por meio do teste de MTT para análise de sobrevivência celular e pela formação de micronúcleos durante a fase mitótica do ciclo celular para detecção de mutações cromossômicas.

Diferentes tipos de células podem ser utilizados para estes tipos de análise, sendo que estas podem ser provenientes de linhagens imortalizadas ou de linhagens primárias (Schmalz, 1994; Freshney, 2000). Linhagens celulares permanentes são estáveis, apresentam características biológicas bem definidas e podem ser obtidas a partir de coleções de cultura celulares (Schuster et al., 2001; Galler et al., 2006). Os fibroblastos são as células mais utilizadas para o estabelecimento de linhagens celulares permanentes, pois são células diplóides que tem tendência para se tornarem aneuplóides quando cultivadas por um longo período de tempo, originando assim culturas contínuas (Castro-Silva, 2004). Além disso, estas células têm capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares, sendo, portanto utilizadas em estudos de citotoxicidade de diversos compostos (Freshney, 2000).

No presente estudo, foi utilizado fibroblastos de hamster Chinês (V79) que são pertencentes a uma linhagem de células previamente estabelecida e estão disponíveis comercialmente. Estas células são indicadas para analisar o comportamento biológico de materiais dentários, devido suas características celulares estáveis, bem definidas em condições experimentais e sua relevância para análise *in vitro* envolvendo estes materiais (Huang, Chang, 2002; Tai et al., 2001). Além disso, é uma linhagem geneticamente idêntica o que propicia experimentos reproduzíveis e padronizados (Huang, Chang, 2002).

Em diversos estudos na Literatura (Bouillaguet et al., 2004; Cavalcanti et al., 2005; Lodiene et al., 2008; Camargo et al., 2009; Karapinar-Kazandag et al., 2011) e no presente estudo, a citotoxicidade e genotoxicidade de materiais dentários foi mensurada utilizando extratos

obtidos a partir destes materiais. Desta forma, os espécimes são preparados e colocados em uma solução na qual os materiais são capazes de liberar suas substâncias formando extratos (Schmalz, 1994). Assim, a análise de substâncias liberadas pelos materiais durante o tempo de presa ou polimerização pode ser avaliada (Cavalcanti et al., 2005). Clinicamente, os materiais dentários são inseridos dentro da cavidade recém misturados, com presa incompleta e provavelmente após a aplicação clínica, respostas locais são provocadas pelos componentes não reagidos ou parcialmente reagidos destes materiais. Depois da presa, ainda é possível que constituintes potencialmente tóxicos possam ser liberados destes materiais (Huang, Chang, 2002). Portanto, uma situação clínica também pode ser mimetizada, já que o tempo de presa ou polimerização dos materiais é realizado em ambiente úmido, permitindo que o estudo seja ainda mais clinicamente relevante (Cavalcanti et al., 2005).

Eldeniz et al. (2007) relatam que quanto mais fresco o cimento é colocado para a obtenção do extrato, maior é a citotoxicidade, e mais próximos da realidade são os resultados, uma vez que, clinicamente, os cimentos são colocados imediatamente após a manipulação. Entretanto, a avaliação de períodos de tempo longos depois da manipulação dos cimentos também é importante para observar as mudanças e a possível diminuição da citotoxicidade.

No presente estudo os espécimes dos materiais foram preparados e padronizados de acordo com as normas da ISO (1992) que propõe a padronização dos espécimes na relação área/volume de 50 a 600 mm²/mL em que a superfície do material em contato com o meio de cultura permitiu a liberação de substâncias pelo material durante o seu tempo de endurecimento. No presente estudo foi utilizada a relação 82,4 mm²/mL, os espécimes foram preparados e após 12 h de endurecimento foram colocados em contato com o meio de cultura, para que fosse

avaliado um período intermediário entre o contato imediato dos cimentos com o organismo até seu completo endurecimento.

O ensaio com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) vem sendo utilizado como um teste de citotoxicidade *in vitro* em culturas celulares devido sua rapidez e objetividade. O princípio desse teste baseia-se na capacidade das células viáveis em reduzirem o sal do MTT em seu metabolismo mitocondrial. Esse sal reduzido adquire uma coloração roxa, que pode ser mensurada em espectrofotômetro utilizando-se um leitor de Elisa (Kim et al., 2007). Este ensaio foi utilizado por muitos autores com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de diversos materiais para aplicação na Odontologia (Huang et al., 2002b; Lodiene et al., 2008; Al-Hiyasat et al., 2010), sendo também o teste de escolha para a realização do presente estudo, por oferecer resultados mais precisos, sendo sensível a pequenas alterações no metabolismo celular.

O ensaio de micronúcleo tem sido extensivamente utilizado como método citogenético para avaliar os efeitos genéticos e instabilidade dos cromossomos (Huang et al., 2011). A formação de micronúcleo é atribuída a variedade de injúrias ao material genético, que pode ser classificada como fatores exógenos e endógenos (Mateuca et al., 2006).

O EMS foi utilizado no teste de micronúcleos, pois é um material que comprovadamente causa grande indução de micronúcleos nas células V79, sendo considerado um material altamente genotóxico (Schweikl e Schmalz, 2000; Camargo et al., 2009a).

Neste estudo verificou-se que os cimentos EndoREZ, AH Plus e Copaíba foram capazes de induzir a citotoxicidade. Porém, todos os cimentos testados foram analisados no teste de MNT. As concentrações escolhidas para este teste foram as que obtiveram viabilidade celular perto de 50%, pois as que são muito tóxicas provocam

morte celular acentuada das células V79 impossibilitando a contagem do número de micronúcleos (Camargo et al., 2009a).

6.2 Discussão dos Resultados

A citotoxicidade dos quatro cimentos endodônticos testados neste estudo apresentou diferenças significantes entre as diluições. O RoekoSeal, um cimento à base de silicone, foi o único que não apresentou citotoxicidade sobre células V79, mantendo um excelente padrão de sobrevivência celular em todas as diluições, sem diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por Al Awadhi et al. (2004), que mostraram menor atividade apoptótica em osteoblastos embrionários de calvário de rato expostos ao RoekoSeal do que em células expostas ao Kerr's Pulp Canal Sealer (Sybron Kerr, Romulus, MI), sugerindo baixa citotoxicidade deste material e, também, verificaram que as células expostas a este cimento continuaram capazes de se proliferarem após o tratamento, mantendo alto número de células viáveis.

Estes resultados estão de acordo com Bouillaguet et al. (2004), que observaram que o material à base de silicone não foi citotóxico em contato direto com fibroblastos Balb/c 3T3. Porém, observaram que quando realizaram a exposição às células após uma semana do preparo dos espécimes houve pequena supressão de SDH (succinil desidrogenase). Mostrando a importância da realização de estudos longitudinais em torno deste cimento.

Outros estudos também estão de acordo com estes resultados (Schwarze et al., 2002; Oztan et al., 2003; Bouillaguet et al., 2006; Susini et al., 2006, Eldeniz et al., 2007; Lodiene et al., 2008; Karapinar-Kazandag et al., 2011). Contudo há pouca informação quanto

as propriedades físicas deste cimento uma vez que o mesmo, por se tratar de um silicone, é elástico e pode se desprender das paredes do canal em preparos para pino em baixa rotação. Segundo Flores et al. (2011), o RoekoSeal tem seu endurecimento em aproximadamente 40 min, contrai 1,33% e apresenta 0,50% de solubilidade em média.

O AH Plus e o cimento experimental à base do óleo-resina da copaíba obtiveram resultados semelhantes onde os extratos originais 1:1 mostraram-se extremamente citotóxicos, sendo o AH Plus menos tóxico que o cimento à base de Copaíba. Porém, a partir da diluição 1:4 já mostraram viabilidade semelhante ao controle negativo (100% de viabilidade). O cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba, apesar de ter mostrado efeitos tóxicos nas diluições mais altas, apresenta resultados promissores quanto sua utilização clínica, devido suas satisfatórias propriedades físico-químicas nos testes requeridos pela ADA (Garrido et al., 2010) e também por sua atividade antibacteriana (Vasconcelos et al., 2008). Talvez a citotoxicidade presente neste cimento deve-se a resina natural (breu) presente na composição deste cimento (Sunzel et al., 1997).

Estes resultados mostram a importância da realização de mais pesquisas em torno dos fitoterápicos, uma vez que estes estão sendo inseridos no mercado com o intuito de obter materiais mais biocompatíveis. Desta forma, Camargo et al. (2009a), estudaram a citotoxicidade de um outro cimento endodôntico experimental à base do polímero da mamona (Polifil) e observaram um excelente padrão de sobrevivência celular em todas as diluições sobre células tHPC (Fibroblastos de polpa humana imortalizados). A propósito, nas condições em que o estudo foi realizado, os extratos originais produziram apenas uma mínima redução no número de células sobreviventes nos ensaios de cristal violeta (87,9%).

Correa et al. (2009), obtiveram em estudo prévio, severa toxicidade inicial do cimento AH Plus, diminuindo sua toxicidade conforme

maior fosse a diluição (10% e 91% de viabilidade celular nos extratos 100% e 0,0001%, respectivamente). Em 2008, Brackett et al. realizaram um estudo utilizando espécimes do AH Plus durante seis semanas. Os espécimes foram utilizados depois do tempo de endurecimento 72 h, colocados em contato direto com as células (L929) após o tempo de endurecimento, 1, 3, 4 e 6 semanas. O tempo de exposição dos espécimes às células foi de 72 h e entre os experimentos os espécimes foram lavados e incubados em PBS. Após o período de endurecimento de 72 h foi verificado severa citotoxicidade, porém após a primeira semana a atividade mitocondrial da células aumentou para 50%, mantendo este nível nas semanas seguintes.

Miletic et al. (2005) mostraram que o AH Plus apresentou alta citotoxicidade imediatamente após o preparo e após 24h e 48h de tempo de endurecimento em contato com células de carcinoma cervical de humanos (HeLa) e fibroblastos de rato L929. Após período de 7 e 30 dias, não foi observado destruição nas culturas celulares após aplicação direta do AH Plus. Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste estudo e também com outros que mostraram citotoxicidade em diferentes níveis (Huang et al., 2004; Eldeniz et al., 2007; Camargo et al., 2009a; Al-Hiyasat et al., 2010).

Embora o fabricante do cimento à base de resina epóxica AH Plus alegar que este material não libera formaldeído em relação ao seu precursor AH 26, sua citotoxicidade inicial pode ser atribuída à liberação mínima de formaldeído pelas aminas adicionadas para acelerar a polimerização epóxica (Eldeniz et al., 2007; Merdad et al., 2007) ou ao seu componente resinoso (Eldeniz et al., 2007).

Em contraste aos resultados aqui mostrados, outros estudos tem relatado nenhuma ou pouca atividade citotóxica do cimento AH Plus, como Karapinar-Kazandag et al. (2011), que estudaram extratos do AH Plus em diversas concentrações em células L929 e células primárias pulpares de humanos no tempo de endurecimento fornecido

pelo fabricante – 8 h, e Lodiene et al. (2008) em que o AH Plus não exibiu citotoxicidade após tempo de endurecimento de 24 h no teste de difusão em filtro e de MTT, utilizando as mesmas células. Em contrapartida, quando avaliado no tempo de endurecimento 0 h, este último estudo mostrou efeitos tóxicos no teste de difusão em filtro.

Öztan et al. (2003) mostraram que o cimento à base de resina epóxica AH Plus e o cimento à base de silicone RoekoSeal tiveram níveis similares de citotoxicidade em fibroblastos de ratos. Resultados similares foram obtidos por Schwarze et al. (2002), que usaram fibroblastos imortalizados 3T3 e fibroblastos primários de ligamento periodontal humano. A discrepância destes pode ser explicada pela variação das condições experimentais, que podem não permitir uma situação de sensibilidade na obtenção de extratos originais.

Neste estudo, o EndoREZ foi o cimento mais citotóxico, comprometendo severamente a viabilidade celular em todas as diluições (1,09% - 1:1; 0,72% - 1:2; 23,54% - 1:4; 41,95% - 1:8; 59% - 1:16; 75,59% - 1:32) e diferindo de todos os outros cimentos testados. Comparando este resultado com o obtido por Camargo et al. 2009a, com o cimento Epiphany, outro material derivado de metacrilatos, o EndoREZ foi muito mais citotóxico. O primeiro reduziu para 15% a sobrevivência celular no extrato 1:1 aumentando gradativamente a sobrevivência com o aumento da diluição (30,95% - 1:2; 59% - 1:4; 76,90% - 1:8; 86,30% - 1:16; 96,15% - 1:32). Confirmando esta comparação o cimento AH Plus teve comportamento idêntico nos dois estudos.

Um dos poucos trabalhos que mostra um bom comportamento do EndoREZ, frente a culturas celulares de fibroblastos de polpa humana e fibroblastos de rato L929, é o de Karapınar-Kazandag et al. (2011) que avaliaram os efeitos dos extratos por teste de MTS (um teste similar ao MTT, identificado pela redução do “tetrazólio”); neste estudo também foi utilizado a proteção dos espécimes durante o endurecimento do cimento, para que o oxigênio não interferisse neste

processo. Sendo o AH Plus, EndoREZ e RoekoSeal não citotóxico as duas culturas celulares nos três períodos de eluição (1, 4 e 7 dias). Provavelmente estes resultados foram diferentes da maioria dos trabalhos devido a baixa relação área/volume (mm^2/mL), pois neste estudo um anel de Teflon de 4mm de diâmetro por 3 mm de altura foi colocado em contato com 2,5 mL de meio de cultura ($25,13 \text{ mm}^2/\text{mL}$), o recomendado pelas normas da ISO (1992) que propõe a padronização dos espécimes na relação área/volume de 50 a 600 mm^2/mL . Outros estudos também mostraram pouca ou nenhuma citotoxicidade deste material, Miletic et al. (2005) e Lodiene et al. (2008).

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com outros estudos que também observaram citotoxicidade do EndoREZ (Al-Hiyasat et al., 2010; Bouillaguet et al., 2004; Eldeniz et al., 2007; Silva et al., 2008; Ames et al., 2009; Gencoglu et al., 2009). O efeito citotóxico deste material pode ser atribuído ao UDMA presente em sua composição, pois apresenta efeito tóxico (Hikage et al., 1999) e pode causar danos celulares devido a diminuição do nível intracelular de glutathione mesmo em baixas concentrações e em curto período de tempo (Volk et al., 2006).

A discrepância de resultados em torno da citotoxicidade destes cimentos pode ser explicada pelas variações das condições experimentais como mecanismos biológicos, tipo celular, método de contato material-célula, preparação dos extratos e tempo de exposição (Oztan et al., 2003).

Neste estudo, a manipulação do EndoREZ e condicionamento do material foram realizados cuidadosamente seguindo as recomendações do fabricante, especialmente após a espatulação, quando o material foi fotopolimerizado, vedado com parafilme e colocado em estufa de CO_2 para diminuir a influência do oxigênio, fator este que segundo o fabricante impede o endurecimento do material. Contudo o material foi o mais citotóxico dentre os testados. Provavelmente outros fatores além do não endurecimento devem influenciar em sua

citotoxicidade, como o desequilíbrio no mecanismo redox e até mesmo a ação de alguns ativadores não descritos pelo fabricante.

Devido a severa citotoxicidade do EndoRez, do AH Plus e do cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba foi realizado o ensaio de MNT para verificar as possíveis mutações cromossômicas que estes cimentos podem causar.

Desta forma, verificou-se que nas concentrações escolhidas para a análise de genotoxicidade apenas as concentrações do EndoREZ 1:8 e 1:16 foram capazes de induzir a formação de micronúcleos em 14 e 3 vezes mais em relação ao controle negativo, respectivamente. Estes resultados podem ser comparados ao EMS, controle positivo, que aumentou a formação de micronúcleo em 10 vezes em relação ao controle negativo. Sendo, portanto, o cimento EndoREZ mais tóxico que o próprio controle positivo. Os outros materiais não produziram um aumento significativo de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo. Em estudo prévio, Camargo et al. (2009a), verificaram que o cimento derivado de multimetacrilatos Epiphany/RealSeal (BisGMA, ethoxylated BisGMA UDMA, monômeros hidrofílicos, resina EBPADMA com foto iniciador, aminas, estabilizador, vermelho #40), não foi genotóxico quanto a formação de micronúcleos (19 micronúcleos formados para cada 1000 células na diluição 1:8, e o controle negativo 11,5 micronúcleos para cada 1000 células). Considerando que o cimento Epiphany possui o metacrilato UDMA em sua composição, não se pode acarretar a alta genotoxicidade do EndoREZ exclusivamente a presença do UDMA, contudo sua concentração provavelmente é bem maior neste cimento que apresenta apenas este metacrilato em sua composição. Mais estudos devem ser realizados para se entender o real componente responsável por esta alta genotoxicidade do cimento EndoREZ.

Schweikl et al. em 2006, realizando uma revisão da literatura sobre a toxicidade celular e genética de monômeros resinosos

dentais, ressaltaram que o método de indução de genotoxicidade de monômeros resinosos parece estar ligado a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que retardam o ciclo celular induzindo excessiva apoptose celular pela quebra do balanço redox mitocondrial pela inativação dos antioxidantes como a glutatona, ácido ascórbico entre outros.

Alguns estudos prévios observaram severa citotoxicidade e baixa genotoxicidade do cimento AH Plus imediatamente após a manipulação (Lodiene et al., 2008). Este fato corrobora com Camargo et al. (2009a) que analisou este cimento em tempo de endurecimento de 6 h, encontrando resultados muito semelhantes aos do presente estudo (13,5 micronúcleos para cada 1000 células).

Schweikl e Schmalz, (2000), observaram que a resina epóxica da pasta A é o componente mutagênico do AH Plus recém espatulado, uma vez que quando avaliadas separadamente, a pasta B não foi mutagênica, mas a pasta A induziu a formação de micronúcleos. Huang et al. (2002) também verificaram genotoxicidade do AH Plus em extratos realizados com DMSO quando submetidos ao ensaio do cometa.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, Miletic et al. (2003) relatam que os cimentos AH26 e AH Plus não induziram aberrações cromossômicas ou indução de formação de micronúcleos em nenhum período experimental. Também, Leyhausen et al. (1999), verificaram que o AH Plus não apresentou genotoxicidade após tempo de endurecimento de 24 h quando submetido a quatro testes genotóxicos.

Apesar do presente estudo não ter apresentado efeitos mutagênicos nas diluições do cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba, Cavalcanti et al. (2006) estudaram o ácido Kaurenóico, um diterpenoide bioativo presente no óleo da Copaíba, e verificaram que altas concentrações deste ácido induziu danos ao DNA de células V79. Porém, estes danos diminuiram com o aumento das diluições.

Nas condições experimentais em que o estudo foi realizado, pôde-se verificar que o RoekoSeal não apresentou efeitos citotóxicos, tampouco genotóxicos. Os extratos do AH Plus e do cimento experimental à base de óleo resina da Copaíba mostraram citotoxicidade nas diluições mais concentradas, porém não foi observado efeitos genotóxicos. O EndoREZ foi o cimento que apresentou maior efeito citotóxico e genotóxico. Estes resultados podem ser atribuídos ao componente UDMA e a outros ativadores desconhecidos presentes na sua composição.

Entende-se que este estudo foi muito importante na confirmação de resultados anteriores quanto ao AH Plus e o RoekoSeal, também para o entendimento do comportamento do cimento derivado do óleo da Copaíba, verificando que nenhum destes cimentos apresentaram efeito genotóxico, para o ensaio de formação de micronúcleos e que o cimento EndoREZ foi significativamente mais citotóxico que os demais materiais e o único que apresentou um importante efeito genotóxico, formando 2 vezes mais micronúcleos que o controle positivo.

Mais estudos devem ser realizados para que se entenda o comportamento biológico dos cimentos endodônticos, bem como continue se desenvolvendo cimentos experimentais, especialmente derivados de extratos vegetais que possam apresentar efeitos mais biológicos. Também como complementação ao comportamento biológico é importante pesquisar os efeitos longitudinais dos diferentes cimentos quanto a sua biocompatibilidade e resistência a degradação no interior dos canais.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir que todos os cimentos testados foram citotóxicos com exceção do RoekoSeal que apresentou resultados semelhantes ao controle negativo. O AH Plus e o cimento experimental da copaíba apresentaram-se tóxicos somente no extrato original e na diluição 1:2, finalmente o EndoREZ foi capaz de induzir citotoxicidade em todas as diluições testadas, sendo significativamente mais citotóxico que os demais cimentos.

Quanto a genotoxicidade pela formação de micronúcleos, apenas o EndoREZ foi capaz de induzir formação de micronúcleo, quase 1,5 x mais que o controle positivo EMS, apresentando-se altamente genotóxico.

8 REFERÊNCIAS*

Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacogn. 2007 Jan;17(1):114-40.

Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. J Endod. 2004 Jul;30(7):527-33.

Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. Int Endod J. 2010 Feb;43(2):148-53.

Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, Bryan TE, Lockwood PE, Sui M, et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. J Endod. 2009 Feb;35(2):225-8.

Andrighetti-Fröhner CR, Kratz JM, Antonio RV. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. Mutation Res. 2006 Jan;603(1):97-103.

Bandeira MFCL, Oliveira MRB, Benatti-Neto C, Camelli Lia RC. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da Copaifera multijuga(óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. J Bras Clin Estet Odontol. 1999 Jul;3(16):42-9.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] Disponível em: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bandeira MFCL, Teixeira MFS, Abinader CD, Parente RC, Lima PSL. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo da copaíba. Rev Dentística on line. 2006;13:12-22.

Bergmans L, Moisiadis P, De Munck J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Effect of polymerization shrinkage on the sealing capacity of resin fillers for endodontic use. J Adhes Dent. 2005 Winter;7(4):321-9.

Biavatti MW, Dossin D, Deschamps FC, Lima MP. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. Rev Bras Farmacogn. 2006 Apr;16(2):230-5.

Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. Eur J Oral Sci. 2004 Apr;112(2):182-7.

Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. J Endod. 2006 Oct;32(10):989-92.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. Int Endod J. 2008 Dec;41(12):1072-8.

Bruneton J. Eléments de phytochimie et de Pharmacognoise. Paris: Lavoisier; 1987.

Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, et al. In vitro genotoxicity of root canal sealers. Int Endod J. 2009 Mar;42(3):253-63.

Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho TL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. Pesqui Odontol Bras. 2001Jul;15(3):257-62.

Camargo CH, Camargo SE, Valera MC, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009a Dec;108(6):952-60.

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009b Mar;42(3):227-37.

Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod.* 2003 Sep;29(9):583-6.

Camps J, Salomon JP, Pertot WJ, Dejou J. The coherence between 3 evaluation methods of biocompatibility. *J Biol Buccale.* 1992 Dec;20(4):211-7.

Castro-Silva JPMS. Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na proteção do estresse oxidativo [dissertação]. Portugal: Escola de Ciências, Universidade do Minho; 2004.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol.* 2006 Mar;44(3):388-92.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):505-9.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod.* 1998 Sep;24(9):604-6.

Cobankara FK, Adanir N, Belli S, Pashley DH. A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers. *Int Endod J.* 2002 Dec;35(12):979-84.

Correa GT, Veranio GA, Silva LE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MF. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *J Appl Oral Sci.* 2009 Sep;17(5):457-61.

Dallan L. Alterações estruturais e moleculares (cDNA) precoces em veias safenas humanas cultivadas sob regime pressórico arterial. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2004 Apr;19(2):126-35.

da Silva PT, Pappen FG, Souza EM, Dias JE, Bonetti Filho I, Carlos IZ, et al. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. *Braz Dent J.* 2008 Sep;19(3):228-31.

Decordier I, Kirsch-Volders M. The in vitro micronucleus test: from past to future. *Mutat Res.* 2006 Aug 4;607(1):2-4. Epub 2006 May 24.

Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007 May;40(5):329-37.

Flores DSH, Rached-Júnior FJA, Versiani MA, Guedes DFC, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J.* 2011 Feb;44(2):126-35.

Freshney RI. *Culture of Animal Cell: a manual of basic technique.* 4th ed. Indianapolis: Wiley Liss; 2000.

Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci.* 2006 Apr;114(2):138-46.

Garrido AD, Lia RC, Franca SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J.* 2010 Apr;43(4):283-91.

Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem.* 2010 Nov;112(6):567-75.

Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *Aust Endod J.* 2001 Apr;27(1):12-21.

Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):90-3.

Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J.* 1988 Mar;21(2):89-99.

Hovland EJ, Dumsha TC. Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex. *Int Endod J.* 1985 Jul;18(3):179-82.

Hikage S, Sato A, Suzuki S, Cox CF, Sakaguchi K. Cytotoxicity of dental resin monomers in the presence of S9 mix enzymes. *Dent Mater J.* 1999 Mar;18(1):76-86.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J.* 2002 Nov;35(11):905-9.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002 Feb;35(2):153-8.

Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials.* 2002 Jan;23(1):77-83.

Huang Y, Fenech M, Shi Q. Micronucleus formation detected by live-cell imaging. *Mutagenesis.* Jan;26(1):133-8.

Hume WR. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. J Am Dent Assoc. 1986 Nov;113(5):789-91.

Huumonen S, Lenander-Lumikari M, Sigurdsson A, Orstavik D. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. Int Endod J. 2003 Apr;36(4):296-301.

ISO documento 10993, Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity *in vitro* methods, 1992.

Karapinar-Kazandag M, Bayrak OF, Yalvac ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. Int Endod J. 2011 Feb;44(7):626-34.

Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. Oral Dis. 2007 Sep;13(5):495-9.

Kim JS, Baek SH, Bae KS. In vivo study on the biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. J Endod. 2004 Oct;30(10):708-11.

Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu LS, Kim SK, Pashley DH, et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. J Endod. 2010 Mar;36(3):383-99.

Leonardo MR, Flores DS, de Paula ESW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. J Endod. 2008 Jul;34(7):822-5.

Leal JM, Leonardo MR. Endodontia: Tratamento de canais radiculares. In: Leal JM. Obturação dos canais radiculares: considerações gerais. 3ª Ed. São Paulo: Médica Panamericana; 1998. p. 535-45.

Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod.* 1999 Feb;25(2):109-13.

Lima SR, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytother Res.* 2003 Nov;17(9):1048-53.

Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2008 Jan;41(1):72-7.

Louw NP, Pameijer CH, Norval G. Histopathological evaluation of a root canal sealer in subhuman primates [Abstract]. *J Dent Res.* 2001;79:654.

Maistro EL, Carvalho JC, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol In Vitro.* 2004 Jun;18(3):337-42.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res.* 2003 Aug;82(8):592-6.

Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006 Nov;88(11):1515-31.

Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J Endod.* 2007 Jan;33(1):24-7.

Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod.* 2005 Apr;31(4):307-9.

Miletic I, Jukic S, Anic I, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Osmak M. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int Endod J.* 2003 May;36(5):330-5.

Orstavik DAG. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics.* 2005 Nov;12(1):25-38.

Oztan MD, Yilmaz S, Kalayci A, Zaimoglu L. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *J Oral Rehabil.* 2003 Apr;30(4):426-9.

Pascon EA, Sousa CJA, Langeland K. Biocompatibility of endodontic materials: cytotoxicity of a polyurethane resin derived from castor beam oil. *Braz Endod J.* 2001;5:5-12.

Pereira CC, de Oliveira EP, Gomes MS, Della-Bona A, Vanni JR, Kopper PM. Comparative in vivo analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in dog teeth after post-space preparation. *Aust Endod J.* 2007 Dec;33(3):101-6.

Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. *Int Dent J.* 1980 Jun;30(2):140-88.

Ribeiro DA, de Lima PLA, Marques ME, Salvadori DM. Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J.* 2006;17(2):91-4.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *J Endod.* 2004 Aug;30(8):593-6.

Ribeiro DA, Scolastici C, De Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 May;99(5):637-40.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res.* 2006a Jan;20(1):47-51.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006b Feb;101(2):258-61.

Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 2005 Sep;47(3):135-8.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 May;103(3):277-81.

Scelza MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod.* 2001 Dec;27(12):741-3.

Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J.* 2003 Oct;36(10):660-9.

Schmalz G, Hoffmann M, Weis K, Schweikl H. Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. *J Endod.* 2000 May;26(5):284-7.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22 Suppl 2:S6-11.

Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod.* 2001 Apr;27(4):259-65.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod.* 2002 Nov;28(11):749-53.

Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig.* 1998 Sep;2(3):125-9.

Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH plus. *Biomaterials.* 2000 May;21(9):939-44.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006 Oct;85(10):870-7.

Souza NJA, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J.* 2006;39(1):40-7.

Sunzel B, Soderberg TA, Johansson A, Hallmans G, Gref R. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1997 Oct;37(1):20-8.

Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endod J.* 2006 Dec;39(12):940-4.

Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod.* 2001 Sep;27(9):571-3.

Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res.* 2001 Jan;59(1):73-7.

Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers

using an in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jan;59(1):73-7.

Tay FR, Loushine RJ, Monticelli F, Weller RN, Breschi L, Ferrari M, et al. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. *J Endod.* 2005 Sep;31(9):659-64.

Testarelli L, Andreasi Bassi M, Gambarini G. In vitro evaluation of five root canal sealers. *Minerva Stomatol.* 2003 Jan;52(1-2):19-24.

Vasconcelos KRF, Veiga Jr VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resin de *Copaifera multijuga* Hayne. *Braz J Pharmacogn.* 2008;18(supl.):733-8.

Veiga Jr VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jun;112(2):248-54.

Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J.* 2006 Jun;39(6):464-71.

Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2006 Jun;22(6):499-505.

Waltimo TM, Boiesen J, Eriksen HM, Orstavik D. Clinical performance of 3 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Jul;92(1):89-92.

Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod.* 2000 Dec;26(12):703-7.

Wu MK, Tigos E, Wesselink PR. An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: a leakage study in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Oct;94(4):499-502.

Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR. A 1-year follow-up study on leakage of single-cone fillings with RoekoRSA sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 May;101(5):662-7.

Zmener O, Banegas G, Pameijer CH. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):457-9.

Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of moist root canal dentin with the use of methacrylate-based endodontic sealers: an in vitro coronal dye leakage study. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):76-9.

Zmener O, Pameijer CH. Clinical and radiographic evaluation of a resin-based root canal sealer. *Am J Dent.* 2004 Feb;17(1):19-22.

Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 2004 May;30(5):348-51.

ANEXO A – Certificado do comitê em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **25/2009-PA/CEP**, sobre **“Avaliação in vitro da genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos em culturas celulares”** sob responsabilidade de **GLEYCE OLIVEIRA SILVA**, tendo como orientador o Prof. Adjunto **CARLOS HENRIQUE RIBEIRO CAMARGO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 23 de setembro de 2009



Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora