

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

BARBARA MARIA GARBELOTTI FORTUNATO

**CALEN® ESPESSADA COM ÓXIDO DE ZINCO E ENDOSEQUENCE® BC
APRESENTAM MAIORES TAXAS DE VIABILIDADE CELULAR DO QUE
ENDOMETHASONE N® POR MEIO DO ENSAIO DO MTT EM CULTURA DE
LINFÓCITOS HUMANOS**

RIBEIRÃO PRETO

2018

BARBARA MARIA GARBELOTTI FORTUNATO

**CALEN ESPESSADA COM ÓXIDO DE ZINCO E ENDOSEQUENCE® BC
APRESENTAM MAIORES TAXAS DE VIABILIDADE CELULAR DO QUE
ENDOMETHASONE N® POR MEIO DO ENSAIO DO MTT EM CULTURA DE
LINFÓCITOS HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Cirurgiã-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho

RIBEIRÃO PRETO

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

FORTUNATO, BMG

CALEN ESPESSADA COM ÓXIDO DE ZINCO E ENDOSEQUENCE® BC APRESENTAM MAIORES TAXAS DE VIABILIDADE CELULAR DO QUE ENDOMETHASONE N® POR MEIO DO ENSAIO DO MTT EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Fortunato, BMG, Ribeirão Preto, 2018.

45p; 30cm

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Carvalho, Fabricio Kitazono de

FOLHA DE APROVAÇÃO

FORTUNATO, BMF. CALEN ESPESSADA COM ÓXIDO DE ZINCO E ENDOSEQUENCE® BC APRESENTAM MAIORES TAXAS DE VIABILIDADE CELULAR DO QUE ENDOMETHASONE N® POR MEIO DO ENSAIO DO MTT EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Trabalho de Conclusão de Curso

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Cirurgiã-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A **Deus** e **Nossa Senhora Aparecida** pela família, saúde, amor e força me dada.

Aos meus pais, **Janete** e **Rogério** por sempre acreditarem e investirem em mim. Todo amor, carinho e dedicação foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós, **Estel** e **Rubens** (*in memoriam*), por todo amor me dado sempre. Obrigado por me olharem de onde estiverem. Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** e a todo seu corpo docente, além da direção e administração, que trabalham para proporcionar um ensino de excelência a nós alunos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho** pela paciência, dedicação, ensinamentos e incentivo que permitiram a realização deste trabalho.

À **Prof^a. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, bem como à funcionária **Regislaine Valéria Burim**, por todo auxílio técnico como acadêmico.

À **Nilza Letícia Magalhães**, técnica de laboratório, pela ajuda na execução laboratorial deste trabalho, sempre disposta a sanar dúvidas e alegria contagiante.

A pós-graduanda em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Preto da Universidade de São Paulo, **Fernanda Vicioni Marques** por ter me ajudado sempre que precisei, sanando dúvidas, me ajudando a realizar pesquisas e me acompanhando durante todo o período deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento da Clínica Infantil, **Matheus Morelli Zanela**, **Filomena Leli Placciti** e **Micheli Cristina Leite Rovanholo** sempre solícitos conosco.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa concedida.

Aos **professores da banca examinadora** pela atenção dispensada a leitura deste trabalho.

FORTUNATO, BMG. **Calen® espessada com óxido de zinco e EndoSequence® BC apresentam maiores taxas de viabilidade celular do que Endomethasone N® por meio do ensaio do MTT em cultura de linfócitos humanos.** Ribeirão Preto, 2018. 45 p. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Durante o procedimento de obturação dos canais radiculares pode haver contato direto dos materiais obturadores dos canais radiculares com os tecidos periapicais. Estudos mostram que esses materiais, caso não apresentem biocompatibilidade, podem causar respostas inflamatórias, alérgicas e genotóxicas. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade por meio do Ensaio do MTT, em cultura de linfócitos humanos, de materiais obturadores de canais radiculares. **Materiais e métodos:** Para a realização do experimento, os materiais EndoSequence® BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, EUA), Endomethasone® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) e Calen® (SS White, São Cristóvão-RJ, Brasil) espessada com óxido de zinco, nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 foram submetidos ao Ensaio do MTT utilizando cultura primária de linfócitos humanos. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Mann-Whitney (teste não-paramétrico one-way ANOVA) com nível de significância de 5%. **Resultados:** Observou-se que o Endomethasone N® foi o mais citotóxico sobre linfócitos, sendo dose-dependente. A Calen® espessada não foi citotóxica em nenhuma das diluições. O EndoSequence® BC Sealer apresentou citotoxicidade nas diluições dos extremos (1:2 e 1:32) e resultados adequados de viabilidade celular nas diluições intermediárias (1:4, 1:8 e 1:16) **Conclusão:** Endomethasone N® foi o material mais citotóxico, apresentando característica dose-dependente. Calen® espessada com óxido de zinco apresentou viabilidade celular e ausência de citotoxicidade em todas as diluições estudadas. EndoSequence® BC Sealer apresentou citotoxicidade nas diluições extremas e viabilidade celular nas diluições intermediárias.

Palavras-chave: viabilidade celular, endodontia, citotoxicidade.

FORTUNATO,BMG. **Calen® thickened with zinc oxide and EndoSequence® BC had the highest rates of cell viability than Endomethasone N® by the MTT assay in human lymphocyte culture.** Ribeirão Preto, 2018. 45 p. Final paper - School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

During the procedure of obturation of the root canals there may be direct contact of the obturator materials of the root canals with the periapical tissues. Studies show that these materials, if they do not present biocompatibility, can cause inflammatory, allergic and genotoxic responses. **Objective:** The objective of this work was to evaluate the cytotoxicity by MTT assay in human lymphocyte culture of root canal obturator materials. **Materials and Methods:** EndoSequence® BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, USA), Endomethasone® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) and Calen® (SS White, São Cristóvão-RJ, Brazil) thickened with zinc oxide at the dilutions of 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16 and 1:32 were subjected to the MTT Assay using human lymphocyte primary culture. The results were submitted to statistical analysis using the Mann-Whitney test (non-parametric one-way ANOVA test) with a significance level of 5%. **Results:** It was observed that Endomethasone N® was the most cytotoxic on lymphocytes, being dose-dependent. Calen® thickened with zinc oxide was not cytotoxic in any of the dilutions. EndoSequence® BC Sealer showed cytotoxicity at the extreme dilutions (1: 2 and 1:32) and adequate cell viability at intermediate dilutions (1: 4, 1: 8 and 1:16) **Conclusion:** Endomethasone N® was the material more cytotoxic, presenting dose-dependent characteristics. Calen® thickened with zinc oxide showed cell viability and absence of cytotoxicity at all dilutions studied. EndoSequence® BC Sealer showed cytotoxicity at the extreme dilutions and cell viability at the intermediate dilutions.

Key words: cell viability, endodontics, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT para Endomethasone N® em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para cada diluição ($p < 0,05$). 28

Figura 2 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT para Calen® espessada com óxido de zinco em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para cada diluição ($p < 0,05$). 28

Figura 3 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT para Endosequence® BC Sealer em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para cada diluição ($p < 0,05$). 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de cada material estudado e fabricante.....	23
-------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. PROPOSIÇÃO	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Materiais obturadores de canais radiculares a serem avaliados	22
3.2 Apresentação comercial dos materiais avaliados	22
3.3 Avaliação da citotoxicidade dos cimentos obturadores de canais radiculares por meio do MTT	23
3.3.1 Procedimentos éticos	23
3.3.2 Preparo das culturas celulares	23
3.3.3 Ensaio do MTT	24
3.3.4 Determinação da validade do ensaio	25
3.4 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	38
8. ANEXO	44

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Alguns autores na Endodontia contemporânea preconizam a obturação dos canais radiculares nos limites do forame apical, podendo ocorrer durante o processo de obturação/condensação dos canais radiculares um leve extravasamento de cimento endodôntico, conhecido como “puff” (Ruddle, 1994). Segundo Consolaro e Bittencourt (2014), o extravasamento do material no periodonto apical dificulta o processo de reparo, sendo que as consequências podem permanecer como lesões inflamatórias crônicas. Dessa forma, torna-se indispensável que os materiais obturadores de canais radiculares sejam bem aceitos pelos tecidos periradiculares, visto que estes materiais podem ficar em contato direto com os tecidos periapicais por período indeterminado de tempo. Ainda, esses materiais podem ser extravasados na forma de “puff”, e ainda os componentes derivados desses materiais podem vir a entrar em contato direto com os tecidos por numerosas conexões, incluindo túbulos dentinários, canais acessórios, canais laterais e o forame apical (Koch, 2001), o que leva à irritação e reparação tardia, provocando também possível desconforto pós-operatório (Tepel et al., 1994; Geurtsen e Leyhausen 1997; Tanomaru Filho et al., 1998; Hauman e Love 2003; Schafer e Zandbiglari 2003; Seltzer, 2004; Huang et al., 2005; Donnelly et al., 2007; Spagnuolo et al., 2008; Badole et al., 2013; Reichl et al. 2015; Rodríguez-Lozano et al., 2015).

Como o cimento endodôntico permanecerá por um período indefinível de tempo em contato com as células do ligamento periodontal, este deve apresentar biocompatibilidade adequada, definida como a capacidade de um material exercer suas funções específicas, quando aplicado em tecidos vivos, sem causar danos ou prejuízos ao mesmo (Jorge et al., 2004; Anusavice et al., 2013). Caso não apresente compatibilidade tecidual, o material poderá induzir reações inflamatórias, alérgicas ou genotóxicas, podendo ocasionar injúrias locais ou à distância, uma vez que o ligamento periodontal é altamente vascularizado (Van Landuyt et al., 2012; Lima et al., 2016). Esta propriedade relaciona-se diretamente com a composição dos materiais. Como exemplo, pode ser citada a liberação de substâncias tóxicas por materiais à base de óxido de zinco e eugenol, se mantidos durante um período prolongado, podendo manter uma inflamação constante (Zmener et al., 2012); ainda, os materiais à base de metacrilato possuem alguns componentes que podem não polimerizar e são tóxicos para os tecidos periapicais (Augsburger e Peters, 1990); e materiais que contêm resina epóxi apresentam um grau de citotoxicidade (Huang et al., 2002; Eldeniz et al., 2007) e inflamação

severa (Holland e Souza, 1985; Huang et al., 2003), sendo alguns considerados mutagênicos para liberação de bisfenol A, éter diglicidílico e formaldeído, substâncias potencialmente carcinogênicas (Camargo et al., 2009).

Os materiais obturadores dos canais radiculares podem ser classificados segundo sua composição química, apresentando-se como cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, cimentos contendo hidróxido de cálcio, cimentos à base de resina, cimentos à base de ionômero de vidro, à base de MTA (Mineral Trióxido Agregado), à base de biocerâmicas e aqueles à base de silicones (Yoshimine et al., 2003; Baraba et al., 2011; Al-Haddad e Aziz, 2016).

O uso de cultura de células *in vitro* faz parte dos protocolos mais utilizados dentre as várias metodologias recomendadas para avaliar a biocompatibilidade e a citotoxicidade de materiais dentários, em diferentes níveis de investigação (Ratanasathien et al., 1995; Martins et al., 2013). Esse fato deve-se à homogeneidade que as amostras apresentam e uma fácil padronização, sendo possível o controle de fatores como pH, temperatura, pressão osmótica e tensão de O₂ e CO₂ (Freshney, 2005). Com isso, pode-se ressaltar a cultura de células primárias, que são produzidas a partir de células retiradas de um tecido por processo de desagregação mecânica, enzimática ou química. Essas células possuem morfologia idêntica ao tecido das quais se originam, sendo que sua cultura permite poucas divisões celulares, entrando após esse processo em estado de senescência e morte, dessa forma podendo assim ser consideradas representativas das condições naturais de um organismo (Schmalz, 1994; Martins et al., 2013). A cultura primária pode ser obtida de células retiradas do sangue, órgãos (rins, fígado, linfonodos, baço, timo e pâncreas) e organismos (embriões) (Takahashi et al., 1990).

De acordo com a ISO 10993-5, o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos é o ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Dentre os vários testes para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* de diversos materiais, um deles é o ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo), que avalia a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, sendo bem aceito na literatura para avaliação de materiais endodônticos (Al-Hiyasat, Tayyar e Darmani 2010; Ashraf et al., 2012; Scelza, Coil e Alves 2012; Candeiro et al., 2015; Mestieri et al., 2015; Rodríguez-Lozano et al., 2015; Silva et al., 2015; Cintra et al., 2017).

Em 1999, Telli et al. avaliaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos à base de fosfato de cálcio pelo ensaio MTT utilizando células L929 (fibroblastos de ratos). Os cimentos analisados foram SARCS (cimentos obturadores de canais radiculares de apatita de Sankin) tipos 1 a 3 em comparação aos cimentos CRCS, Ketac™ Endo, AH26® e Endomethasone® nas diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Obteve como resultado que os cimentos SARCS 1, 2 e 3 e CRCS não apresentaram efeito citotóxico, enquanto que o AH26®, Ketac™ Endo e Endomethasone® produziram alguma citotoxicidade.

Huang et al., em 2002, analisaram a biocompatibilidade de cimentos endodônticos à base de resina epóxica *in vitro* por meio do ensaio MTT nas diluições de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 e 0.10mg/mL. O cimento AH26® apresentou viabilidade celular maior que 100% na diluição de 0,01mg/mL, enquanto que o cimento AH Plus™ teve esse resultado nas diluições de 0,01, 0,02 e 0,04mg/mL.

Em 2009, Al-Hiyasat et al. avaliaram a citotoxicidade dos cimentos AH Plus™, EndoREZ®, Epiphany™ e MetaSEAL™, os quais são a base de resina, por meio do ensaio do MTT em células 3T3 BALB nas diluições de 1:1 e 1:10. Observou-se que nenhum material teve viabilidade de 100%. O MetaSEAL™ apresentou alta toxicidade em relação aos demais materiais. Na diluição de 1:1, o AH Plus™ mostrou-se o menos citotóxico, seguido pelo EndoREZ®, Epiphany™ e MetaSEAL™. Na diluição de 1:10, o AH Plus™ também apresentou como de menor citotoxicidade, seguido pelo Epiphany™, EndoREZ® e MetaSEAL™.

Zhang et al., em 2010, estudou os efeitos do cimento iRoot® SP e do AH Plus™ em células de osteossarcoma humano (MG63) nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4. Notou-se que o iRoot® SP não foi citotóxico em nenhuma das concentrações, enquanto que o AH Plus™ teve citotoxicidade nas concentrações de 1:2 e 1:4.

Em 2012, Bin et al. propuseram a análise de citotoxicidade e genotoxicidade dos cimentos endodônticos a base de Mineral Trióxido Agregado (MTA-Fillapex), em comparação com o cimento MTA White e AH Plus™. Fibroblastos de hamster chinês (V79) foram colocados em contato com diferentes diluições das culturas previamente expostas a tais materiais. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT em espectrofotômetro para checar a viabilidade e sobrevivência das células. A genotoxicidade foi analisada pelo teste dos micronúcleos. A taxa de sobrevivência celular e número de micronúcleos foram avaliados antes e depois da exposição aos cimentos. Para esse estudo, a porcentagem de viabilidade celular ideal foi considerada quando o valor médio obtido foi de 50% ou superior. Os

resultados mostraram que a viabilidade celular do MTA White foi superior a 70% para todas as diluições testadas, sendo assim classificado como um material não citotóxico. Em contrapartida, o MTA-Fillapex foi altamente citotóxico em concentrações elevadas (1:1, 1:2 e 1:4), assim como para o AHPlus™ (exceto na diluição 1:4).

Em 2013, Yoshino et al., pesquisou sobre a citotoxicidade em fibroblastos do ligamento periodontal humano por meio do ensaio do MTT do MTA White, MTA-Fillapex e do cimento Portland nas diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 após 24h, 48 e 72h de incubação. Como resultado apresentou alta viabilidade celular o Portland e o MTA White e em contrapartida, o MTA-Fillapex mostrou alta citotoxicidade,

Candeiro et al. em 2015 propuseram a comparação das características do cimento a base de biocerâmica (EndoSequence® BC) e AH Plus™. A citotoxicidade e genotoxicidade foram analisados em fibroblastos gengivais humanos submetidos ao meio de cultura de células condicionado por cimentos, utilizando o ensaio MTT e formação de micronúcleos (MNT), respectivamente. As células cultivadas em meio fresco serviram como controles. Culturas submetidas à EndoSequence® BC tinham um número significativamente maior de células viáveis ($P < 0,01$) e menos formação de micronúcleos ($P < 0,05$) do que o cimento AH Plus™. O cimento a base de biocerâmica tinha menos citotoxicidade e genotoxicidade e efeito antibacteriano semelhante contra *E. faecalis* em comparação com o cimento AH Plus™.

Em 2016, Silva et al. avaliaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos de dois cimentos obturadores experimentais baseados em extrato de *Copaifera multijuga* e *Ricinus communis* (polímero de mamona) comparando com cimentos à base de resina sintética: à base de metacrilato (EndoREZ®), à base de multi-metacrilato (RealSeal SE™) e à base de resina epóxi (AH Plus™). Foram realizados ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade e formação de MNT para a genotoxicidade com células V79. Para o ensaio de MNT, as células foram expostas à diluição em que aferiu viabilidade celular perto de 50% (normalização para todas as amostras). A maioria das diluições citotóxicas não foi analisada porque não permitiam a proliferação das células, invalidando a análise. Como resultado obteve que o cimento a base de metacrilato foi o único genotóxico quando comparado às culturas de células não tratadas, nenhum dos outros cimentos teve efeito genotóxico significativo; sendo o polímero a base de óleo de rícino não citotóxico e não genotóxico quando comparados com os cimentos à base de resinas sintéticas comercialmente disponíveis.

Silva et al., em 2017, propuseram um estudo da citotoxicidade e indução de apoptose em células RAW 264.7 (tecido subcutâneo de rato) quando expostas aos cimentos RealSeal XT® e Sealapex Xpress™ nas concentrações 1:20, 1:100 e 1:500. Observou-se que nenhum

dos cimentos obteve viabilidade celular maior que 100% e que o Sealapex Xpress™ foi menor citotóxico do que o RealSeal XT®.

Em 2017, Martinho et al. avaliaram a citotoxicidade, genotoxicidade e a atividade de biomarcadores biológicos dos cimentos de endodônticos Apexit® Plus, RealSeal SE®, AH Plus™ e EndoREZ®, para isso foram utilizadas células humanas derivadas da polpa e o teste MTT e MNT. A citotoxicidade foi avaliada na concentração dos cimentos de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 e a genotoxicidade foi avaliada na concentração dos cimentos de 1:2. Concluiu-se que a 1:2 todos os cimentos obturadores foram associados à viabilidade celular reduzida, exceto RealSeal SE®(o qual apresentou maior citotoxicidade e maior potencial inflamatório). Nenhum dos cimentos foi citotóxico a diluições mais elevadas (1:16). Em relação a genotoxicidade, observou-se que todos os cimentos foram incapazes de aumentar a quantidade de micronúcleos significativamente em relação ao controle, exceto o controle positivo.

Em 2017, Cintra et al. avaliaram a citotoxicidade e a biocompatibilidade tecidual de um novo cimento endodôntico à base de resina, utilizando como comparação o AH Plus™, Endofill e SimpliSeal®. Foram utilizados fibroblastos L929 e o ensaio MTT para determinar a citotoxicidade dos extratos. Além disso, tubos contendo o extrato dos materiais e controles foram inseridos subcutaneamente em ratos e foram removidos após 7 e 30 dias para análise histológica. O novo material (SimpliSeal®) promoveu maior viabilidade celular e teve maior compatibilidade tecidual em comparação com os outros materiais.

Um estudo realizado por Colombo et al., em 2018, estudou as propriedades biológicas (citotoxicidade e eficácia antibacteriana) e físico-química (solubilidade e pH) de cimentos endodônticos à base de biocerâmica e os comparou a diferentes cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio, à base de MTA e resina epóxica. Como resultado, em relação à citotoxicidade, obteve-se que os cimentos biocerâmicos não apresentaram efeito citotóxico nas primeiras 24 horas, enquanto que nos extratos de 48h e 72h apresentam leve citotoxicidade, porém não foi notada diferença estatisticamente significativa para todos os tempos.

Outros estudos realizados por Silva et al. (2016); Silva et al. (2017) realizaram análise da citotoxicidade por meio de análise em 3D, sem utilizar diluições seriadas. De modo geral, esses estudos mostraram que o MTA-Fillapex apresenta-se como o mais citotóxico. Ou então, uso do ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade, sem realizar diluições seriadas, mas avaliando após quando tempo os materiais em estudo apresentariam ou não viabilidade celular, sendo o caso dos autores Susini et al.; Donadio et al, cujo estudos mostraram que o material

Resilon® foi o menos citotóxico. Já os estudos realizados por Zoufan et al.; Scelza et al. e Martins et al. obtiveram como resultado que o material menos citotóxico foi o GuttaFlow®.

Pelo exposto, há resultados conflitantes na literatura recente sobre a citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares, além da escassez de trabalhos que avaliam a citotoxicidade de materiais obturadores em linfócitos humanos periféricos, por meio do ensaio MTT. Além disso, continuamente novos materiais são introduzidos no comércio especializado, sendo imprescindível avaliar sua biocompatibilidade para que esses possam ser utilizados na prática clínica de fato mais segura. Além disso, novos materiais devem ser investigados quanto às suas propriedades bioindutores, o que favoreceria o processo de reparo dos tecidos periapicais após o tratamento endodôntico dos canais radiculares.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade dos seguintes materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos e permanentes: EndoSequence® BC Sealer (à base de biocerâmicas); Endomethasone N® (à base de óxido de zinco e Eugenol) e Calen® espessada com óxido de zinco (à base de hidróxido de cálcio).

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares, por meio do ensaio MTT, em cultura de linfócitos do sangue periférico humano.
- ✓ Acrescentar a avaliação da propriedade bioindutora do Endosequence® BC Sealer em comparação à Calen® espessada com óxido de zinco, que já demonstrou ter diversos resultados bons para a biocompatibilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais obturadores de canais radiculares a serem avaliados

Foram utilizados nos experimentos os seguintes cimentos obturadores de canais radiculares: a) à base de biocerâmicas: EndoSequence® BC Sealer (Brasseler USA, Savannah, EUA); b) à base de óxido de zinco e Eugenol: Endomethasone N® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France); c) à base de hidróxido de cálcio: Calen® (SS White, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) espessada com óxido de zinco.

3.2 Apresentação comercial dos materiais avaliados

O cimento EndoSequence® BC Sealer™ (Brasseler USA, Savannah, EUA) não requer manipulação, devendo ser usado diretamente da seringa no qual está contido, de acordo com as instruções do fabricante.

O cimento Endomethasone N® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France), de acordo com as instruções do fabricante, necessita preparar a mistura da pasta, incorporando progressivamente o pó ao líquido (eugenol) à razão de 2 colheres de pó para 3 a 6 gotas de líquido, até a obtenção de uma pasta com a consistência requerida (formação de fio de 1cm).

A pasta Calen® (SS White, São Cristóvão – RJ, Brasil) espessada com óxido de zinco é manipulada na proporção de 1g de pasta para 0,6g de óxido de zinco.

Material	Componente	Ingredientes
EndoSequence® BC Sealer™ (Brasseler USA, Savannah, EUA)		Óxido de zircônio, silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, agentes de carga e de espessamento
Endomethasone N® (Septodont, Saint Maur des Fosses, France)	Pó	Acetato de hidrocortisona, iodeto de timol, sulfato de bário, óxido de zinco, e estearato de magnésio
	Líquido	Eugenol
Calen® (SS White, São Cristóvão- RJ, Brasil) espessada com óxido de zinco	Pasta Calen	Hidróxido de cálcio, óxido de zinco, colofônia, PEG 400 e glicerina
		Óxido de zinco

Tabela 1 - Composição de cada material estudado e fabricante

3.3 Avaliação da citotoxicidade dos cimentos obturadores de canais radiculares por meio do MTT

3.3.1 Procedimentos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) sob o protocolo CAAE 41659915.2.0000.5419.

Para a realização dos experimentos foram obtidas amostras sanguíneas de 6 doadores voluntários adultos, com idade entre 18 e 35 anos, de ambos os gêneros, saudáveis, não-fumantes, que não foram expostos à radiação nos últimos três meses e que não fizeram uso de antibióticos ou outros medicamentos por um período de três semanas. Foram obtidos 10mL de sangue de cada doador voluntário utilizando seringa e agulhas descartáveis, por profissional da área da saúde com experiência em flebotomia, na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Extratos dos materiais endodônticos foram preparados logo após sua manipulação, realizada de acordo com instruções do fabricante, na concentração de 0,1xg/mL, e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas (ISSO 10993-12), sendo então filtrados e condicionados em geladeira a 4°C, por um período máximo de 30 dias.

3.3.2 Preparo das culturas celulares

Os linfócitos foram isolados do sangue total dos voluntários por centrifugação diferencial utilizando gradiente de densidade Ficoll (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), conforme protocolo do fabricante. Os linfócitos foram coletados em tubos plásticos tipo Falcon, lavados e ressuspensos na concentração de 4×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂ em estufa de atmosfera úmida (Thermo Eletronic Serviços e Representação Ltda, Maceió, Alagoas, Brasil), foram realizados os experimentos.

3.3.3 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi descrito primeiramente por Mosmann (1983) e consiste na quantificação de células viáveis por meio da colorimetria. Algumas modificações foram feitas até então, utilizado o reativo 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo, referido comumente como reativo do MTT.

O método avalia a atividade metabólica das células através da quantificação da redução metabólica do MTT a cristais de formazan. Esses cristais são formados devido a ocorrência da redução por meio de uma reação enzimática dos sais do tetrazólio (MTT) envolvendo a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato-tetrazoliumredutase presentes em células viáveis. Os sais tetrazólio, quando reduzidos, formam o sal formazan, apresentando-se hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO), podendo então ser quantificado por espectrofotometria. Dessa forma, quanto maior a formação dos cristais de coloração violeta, maior a porcentagem de viabilidade celular.

Para isso, $1,0 \times 10^6$ linfócitos foram semeados em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24 horas a 37°C em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂. A seguir, as células foram tratadas com 100µL de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (controle negativo) ou 100µL de cada extrato em diferentes diluições (1:32 – 3,125mg/mL; 1:16 – 6,25mg/mL; 1:8 – 12,5mg/mL; 1:4 - 25mg/mL e 1:2 - 50mg/mL). O controle positivo experimental recebeu 100µL de uma solução de metilmetanosulfonato (MMS), que é um agente alquilante e carcinógeno, o qual causa quebra das cadeias duplas do DNA. Após isso, as placas foram novamente levadas à incubadora por 24 horas a 37°C. Em seguida, os poços receberam 20µL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo] (Sigma M2128, EUA) (500µg/mL, concentração final) e as placas incubadas durante 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e invertidas para descartar o sobrenadante. O “formazan” formado, por ser insolúvel, se precipita no fundo do poço, necessitando ser solubilizado antes da leitura, assim, 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma D2650, EUA) foram adicionados em cada um dos poços. Então, as placas foram mantidas sob agitação até a dissolução completa dos cristais (aproximadamente 20 minutos) e, em seguida, a absorbância a 570nm foi determinada em um *microreader* Powerwave XS2 (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). A porcentagem de

viabilidade celular foi calculada a partir da fórmula: % de células viáveis = (absorbância do tratamento x 100)/média do controle negativo.

3.3.4 Determinação da validade do ensaio

A validade do ensaio foi determinada a partir das respostas das células ao tratamento pelo controle positivo (metilmetanosulfonato - MMS) e negativo (meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino). O MMS apresenta uma resposta citotóxica dose dependente bem definida na literatura, caracterizando-se como um bom controle positivo para os tratamentos (Wyatt; Pittman, 2006). A concentração de 100µL de MMS foi selecionada para utilização como controle positivo. O controle celular foi obtido por meio da observação microscópica dos poços de cultura que receberam somente o meio de cobertura.

3.4 Análise estatística

Cada ensaio foi feito em triplicata. Os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5® utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Para o teste de citotoxicidade, todos os tratamentos foram comparados com o controle negativo (RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino) e positivo (metilmetanosulfonato - MMS).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

As várias diluições de cada material foram comparadas aos controles negativo e positivo a fim de avaliar em qual das diluições apresentavam resultados de viabilidade celular compatíveis com os achados da literatura.

Em uma análise qualitativa dos resultados obtidos, observou-se que o Endomethasone N® foi citotóxico sobre linfócitos, com um padrão dose-dependente, sendo considerado como o de pior compatibilidade celular. Pelo gráfico, vemos que as diluições de 1:4, 1:8 e 1:16 foi estatisticamente semelhante ao controle positivo ($p > 0,05$) e diferente do negativo ($p < 0,05$). Já na diluição de 1:2, observamos que houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre ela e os controles positivo e negativo, ou seja, ela foi mais citotóxica que o controle positivo. Na diluição 1:32 também foram observadas diferenças em relação ao controle positivo e negativo ($p < 0,05$). Assim, observamos que o Endomethasone N® é uma material citotóxico dose dependente.

A Calen® espessada foi o material que apresentou os melhores resultados de viabilidade celular, sendo que em todas as diluições não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p > 0,05$).

O EndoSequence® BC Sealer apresentou citotoxicidade nas diluições dos extremos (1:2 e 1:32), visto que foi estatisticamente semelhante ao controle positivo ($p > 0,05$). Nas diluições intermediárias (1:4, 1:8 e 1:16) foi observada viabilidade celular, tendo em vista que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ao controle negativo ($p > 0,05$).

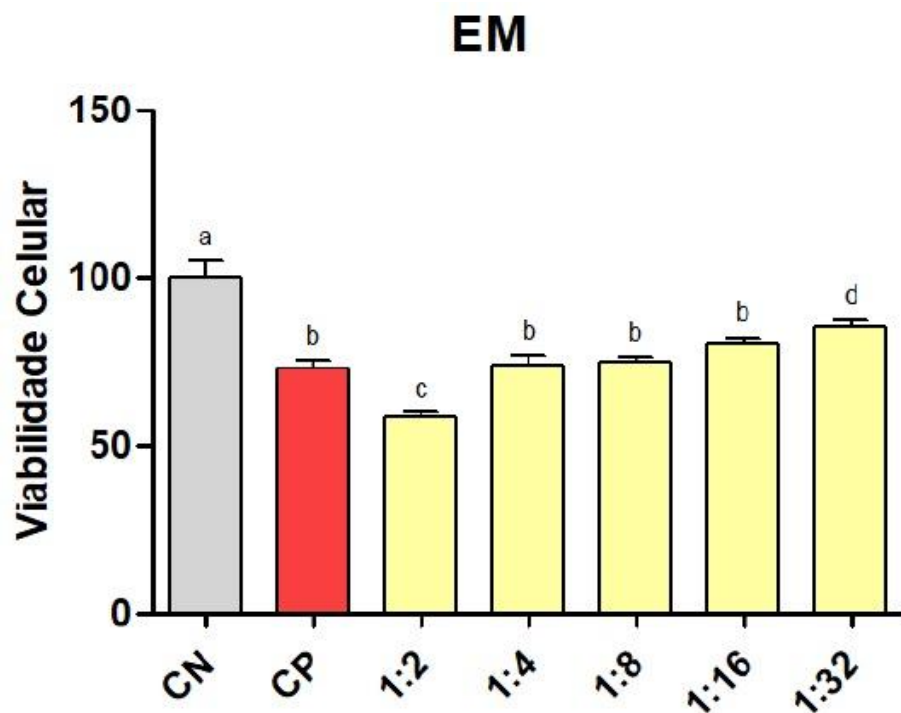


Figura 1 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular no MTT para Endomethasone N® em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para casa diluição ($p < 0,05$).

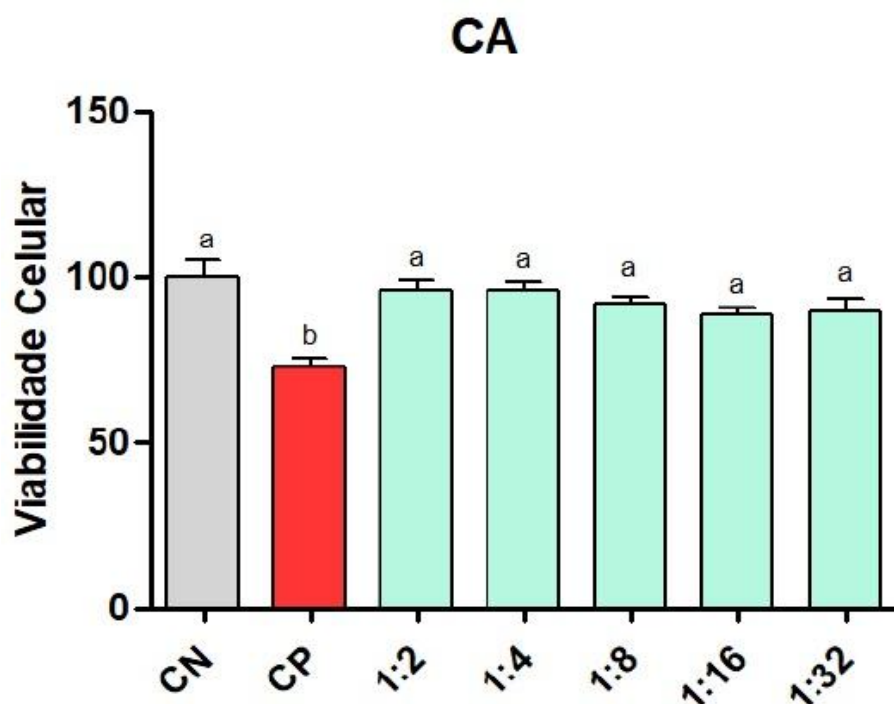


Figura 2 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular no MTT para Calen® espessada com óxido de zinco em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para casa diluição ($p < 0,05$).

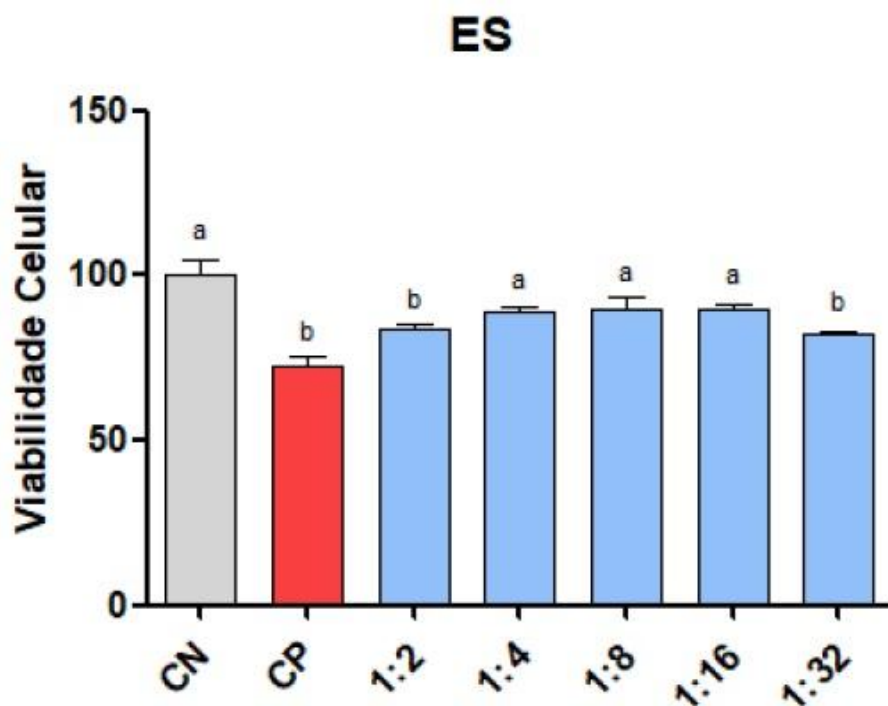


Figura 3 - Gráfico representativo do teste de citotoxicidade por meio de avaliação da viabilidade celular no MTT para Endosequence® BC Sealer em comparação ao controle negativo e positivo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para cada diluição ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A citotoxicidade *in vitro* de diversos cimentos endodônticos tem sido investigada por diversos autores (Augsburger e Peters, 1990; Telli C et al., 1999; Huang et al., 2002; Yoshimine et al., 2003; Eldeniz et al., 2007; Al-Hiyasat AS et al. 2009; Camargo et al., 2009; Al-Hiyasat, Tayyar e Darmani 2010; Zhang W et al., 2010; Baraba et al., 2011; Zmener et al., 2012; Ashraf et al., 2012; Scelza, Coil e Alves 2012; Bin et al., 2012; Yoshino P et al, 2013; Candeiro et al., 2015; Mestieri et al., 2015; Rodríguez-Lozano et al., 2015; Silva et al., 2015; Silva et al., 2016; AL-Haddad e Aziz, 2016; Silva LA et al. 2017; Cintra at al., 2017; Martinho FC et al., 2017; Jung et al., 2018 e Jung et al., 2018). Nesses estudos há uma variedade de resultados indicando que grande parte dos cimentos endodônticos é pouco biocompatível e apresenta alta citotoxicidade quando analisados em cultura de células. Porém, podem ocorrer processos inflamatórios agudos ou crônicos desencadeados quando estes materiais entram em contato direto com os tecidos conjuntivos apicais, os quais podem ocasionar destruição tecidual, formação de lesões granulomatosas, cistos ou outras lesões teciduais (Vidal, 2007).

A citotoxicidade pode estar relacionada com o estresse, lesões reversíveis e irreversíveis das células que antecedem a necrose, nas quais há grande liberação de mediadores e proteínas livres (Consolaro, 2015). Materiais com potencial citotóxico podem estar associados com a dor pós-operatória em tratamentos endodônticos. Após a agressão celular ocorre a liberação e ativação de mediadores químicos da resposta inflamatória, como a histamina, bradicinina e prostaglandinas, sendo esta última associada ao processo de hiperalgesia, ou seja, sensibilização das fibras nervosas sensitivas, responsável pela dor (Seymour e Walton, 1984).

Os protocolos relacionados aos testes de citotoxicidade foram padronizados pela ISO (*International Organization for Standardization*) por meio de uma diretriz emitida em 1992 pela *Food and Drug Administration* (FDA – 1992), onde é descrita uma série de requisitos a serem seguidos e respeitados durante a realização dos testes *in vitro* de citotoxicidade de biomateriais. Três categorias de testes são estabelecidas pelas normas ISO 10993-5, sendo elas: teste por extração, teste de contato direto e teste de contato indireto. Nesse estudo, optamos pela realização dos experimentos por meio de extração, sendo os extratos preparados com materiais obturadores de canais radiculares recém-manipulados, levando-se em consideração estudos feitos por Spangberg e Pascon (1988), onde enfatizaram a importância

do preparo dos biomateriais a serem testados *in vitro* quanto a sua citotoxicidade, concluindo que este deve ser realizado exatamente como a utilização da clínica diária, expressando resultados mais confiáveis.

O ensaio do MTT foi descrito primeiramente por Mosmann (1983) e consiste na quantificação de células viáveis por meio da colorimetria. Esse teste foi desenvolvido como uma alternativa não radioativa ao método de incorporação de timidina ao DNA (Mosmann, 1983) e apresenta como vantagens a rapidez e a precisão, não requerendo radioisótopos (átomos que liberam radiação). Para a realização do ensaio do MTT foram utilizadas células de cultura primária, as quais são as mais indicadas para testes de citotoxicidade de materiais endodônticos, sendo elas linfócitos do sangue periférico humano (Huang et al., 2002). Dentre as vantagens de se usar linfócitos podemos destacar a estabilidade do cariótipo, não apresentar grandes variações de duração do ciclo celular, estarem disponíveis em grandes quantidades em pequenas amostras do sangue periférico, circularem por todos os tecidos e serem comuns aos tecidos periapicais e periodontais (Evans e O’Riordan, 1975; Preston et al., 1987). Preston et al., em 1987, descreveram um protocolo para a padronização do cultivo dessas células para a realização dos experimentos *in vitro*.

Dentre as limitações da avaliação da citotoxicidade *in vitro* podemos citar a avaliação de reações celulares, pois nem sempre o efeito citotóxico *in vitro* é o mesmo *in vivo* (Martins et al., 2013).

O Endomethasone N® no presente estudo apresentou citotoxicidade dose dependente, sendo o mais citotóxico entre os cimentos endodônticos avaliados, o que condiz com Silva et al., 2007, em que relataram que quanto mais diluído o cimento endodôntico, menor a sua citotoxicidade. Estudos prévios realizados com fibroblastos 3T3 e células humanas do ligamento demonstraram que esse material inibiu fortemente a atividade mitocondrial durante as primeiras 24 horas (Gerosa et al., 1995; Schwarze et al., 2002). Esta constatação foi provavelmente devido à liberação de eugenol necessário para a manipulação do Endomethasone N® (ISSO 7405:2008; Gulati et al., 1991; Schwarze et al., 2002) e também à hidrocortisona e o timol presentes nesse cimento, que são substâncias reconhecidamente citotóxicas (Gerosa et al., 1995; Badole et al., 2013).

No estudo de Huang et al., em 2002, onde compararam a citotoxicidade de cinco cimentos, entre eles o Endomethasone N®, obteve resultado semelhantes ao nosso estudo, visto que esse cimento teve o maior grau de citotoxicidade quando comparados aos outros cimentos. O Endomethasone N® apresenta boa atividade antimicrobiana em razão da

presença do eugenol e timol, porém esses componentes também aumentam a toxicidade do material, provocando danos aos tecidos periapicais, o que não compensa seus benefícios antimicrobianos (Gomes et al., 2004).

Os cimentos à base de biocerâmicas tem atraído atenção devido às suas propriedades que oferecem uma composição química com estrutura cristalina similar a apatita do dente e ao tecido ósseo.

Silva et al., em 2017, realizaram um estudo com quatro cimentos endodônticos, dentre eles o EndoSequence® BC Sealer, obtiveram resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, na qual a atividade celular desse cimento foi semelhante ao controle negativo, indicando que não houve efeitos citotóxicos.

Jung et al., em 2018, realizaram um estudo cujo objetivo era avaliar a citotoxicidade de quatro cimentos à base de silicato de cálcio utilizando células de ligamento periodontal humano e ensaio MTT. Esse estudo obteve como resultado que o cimento à base de silicato de cálcio tem influência positiva sobre o metabolismo celular e efeito bioativo (que induz a secreção de fatores de crescimento angiogênicos, tais como VEGF, FGF-2 e BMP-2 a partir do tecido circundante, o que influencia na formação de vasos sanguíneos e osso), em comparação com cimentos à base de resina epóxica, metacrilato ou óxido de zinco e eugenol. No presente estudo, as células expostas ao cimento EndoSequence® BC Sealer apresentaram viabilidade celular nas diluições intermediárias (não apresentando diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle negativo) e isso provavelmente se deve a esses efeitos bioativos. Entretanto, no presente estudo, nas concentrações extremas (1:2 e 1:32), foi observado diferença estatisticamente significativa ao controle negativo, ou seja, menor viabilidade celular. Esse material pode ter apresentado tais resultados para a viabilidade, em comparação à todas diluições, pois mecanismos reativos para a viabilidade celular são despertados tanto na menor diluição, pois está mais concentrado, sendo mais citotóxico à célula, como também quando se apresenta em sua maior diluição.

Um estudo realizado por Colombo et al., em 2018, estudou as propriedades biológicas (citotoxicidade e eficácia antibacteriana) e físico-química (solubilidade e pH) de cimentos endodônticos à base de biocerâmica e os comparou a diferentes cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio, à base de MTA e resina epóxica. Como resultado, em relação à citotoxicidade, obteve-se que os cimentos biocerâmicos não apresentaram efeito citotóxico nas primeiras 24 horas, enquanto que nos extratos de 48h e 72h apresentam leve

citotoxicidade, porém não foi notada diferença estatisticamente significativa para todos os tempos.

Silva et al., em 2008, avaliaram o efeito citotóxico da pasta Calen® associada ou não à clorexidina em cultura celular RAW 264.7 de macrófagos, suas propriedades imunoestimulantes e antiinflamatórias após a exposição dessas células aos materiais. Para a avaliação da citotoxicidade foi usado o ensaio MTT e as seguintes concentrações de material (em gramas) por ml de meio de cultura (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097 e 0,048) e como resultados obteve que a pasta Calen®, associada ou não com a clorexidina, não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações.

Em uma pesquisa realizada por Pires et al., em 2015, cujo objetivo era avaliar a citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro* de quatro pastas à base de iodofórmio e três à base de hidróxido de cálcio (dentre elas a Calen® espessada com óxido de zinco) obteve como resultado que as pastas à base de hidróxido de cálcio apresentou aumento da viabilidade celular. Assim, houve discrepância de resultados em comparação ao presente estudo, visto que não foi observado aumento da viabilidade celular em relação ao controle negativo. Essa discrepância pode ser devido ao tempo de incubação da placa com os tratamentos, visto que elas foram avaliadas após 24h e 72h, além dessa diferença, temos também que foi adicionado 200µL de DMSO e mantidos por 10 minutos sob agitação, enquanto que no presente estudo utilizamos tempo de incubação das placas com o tratamento de 24h, adição de 100µL de DMSO e a mantidos sob agitação para a dissolução dos cristais de “formazan” por aproximadamente 20 minutos.

Em outro estudo, Pilownic et al., em 2017, avaliaram a citotoxicidade de materiais de obturação de canais radiculares entre outras propriedades. Os materiais de análise foram óxido de zinco e eugenol (ZOE), Vitapex e pasta Calen® espessada com óxido de zinco comparadas a um material experimental à base de MTA. A avaliação da citotoxicidade foi feita através do ensaio MTT utilizando fibroblastos gengivais humanos e em relação à pasta Calen® espessada observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular em nenhuma das cinco concentrações. Assim, os estudos citados de Silva et al. (2008) e Pilownic et al (2017) apresentaram resultados semelhantes ao presente, uma vez que a pasta Calen® espessada com óxido de zinco foi o material obturador menos citotóxico, apresentando viabilidade celular em todas as diluições testadas.

Para o bem-estar dos pacientes e melhores respostas clínicas (como ausência de dor, recidiva de lesão) é fundamental a utilização de materiais que apresentem biocompatibilidade e preferencialmente ausência de citotoxicidade, pois o paciente já se expõe a diversas fontes que podem causar agressões celulares durante a sua vida (como sol e exames radiográficos), que tem efeito acumulativo. Além disso, os testes realizados no presente estudo não permitem inferir a respeito de mutagenicidade e carcinogenicidade, assim, estas propriedades devem ser avaliadas em estudos adicionais.

Para uso clínico, devemos optar sempre pelo material que apresente melhor biocompatibilidade e baixa de citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. No presente estudo, os melhores resultados com relação à citotoxicidade foram observados para a Calen® espessada com óxido de zinco (não citotóxica em todas as diluições) e EndoSequence® BC Sealer (não citotóxica nas diluições intermediárias).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações e condições específicas deste trabalho, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O Endomethasone N® demonstrou características de citotoxicidade sobre os linfócitos nas diferentes concentrações, sendo o mais citotóxico entre os materiais estudados, apresentando característica dose-dependente;
- A Calen® espessada com óxido de zinco apresentou viabilidade celular e ausência de citotoxicidade em todas as diluições estudadas;
- O EndoSequence® BC Sealer apresentou citotoxicidade nas diluições extremas e viabilidade celular nas diluições intermediárias. Essa viabilidade celular notada nas concentrações 1:4, 1:8 e 1:16 provavelmente deve-se às suas propriedades bioativas.
- A pasta Calen® espessada com óxido de zinco foi o material que apresentou os melhores resultados de citotoxicidade, seguida pelo EndoSequence® BC Sealer, que também apresentou bons valores de viabilidade celular. Já o Endomethasone N® apresentou os piores resultados, sendo citotóxico em todas as diluições testadas.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater.* 2016;2016

Anusavice JK, Shen C, Rawls RH. *Philips Materiais Dentários - Tradução Roberto Braga.* 12ª edição – Rio de Janeiro. Elsevier; 2013. Cap. 8, p.160-89.

Baraba A, Zelježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J.* 2011 Jul;44(7):652-61.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012 Apr;38(4):495-500.

Camargo CHR, Camargo SEA, Valera MC, Hiller K, 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* 2009; 108:952-960.

Candeiro GT, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, Azambuja-Júnior N, Marques MM, Cai S, Gavini G. *Int Endod J.* 2015 Aug 17.

Coll JA, Sadrian R. Predicting pulpectomy success and its relationship to exfoliation and succedaneous dentition. *Ped Dent.* Jan-Feb 1996;18(1):57-63.

Dearfield, K.L.; Cimino, M.C.; McCarrol, N.E.; Mauer, I.; Valcovic, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p. 121-135, 2002.

Eldeniz AU, Shehata M, Högg C, Reichl FX. DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. *Int Endod J.* 2015 Nov 17.

Silva GO, Cavalcanti BN, Oliveira TR, Bin CV, Camargo SE, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clin Oral Investig*. 2016 May; 20(4):815-9.

Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, Valera MC. Several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *Int Endod J*. Apr 25.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.

Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP* 2004;33(2):65-58.

Lima NG, Trevizan M, Carvalho FK, Nelson-Filho P, Consolaro A. Can root canal sealers induce cancer? How can we investigate that? *Dental Press Endod*. 2016 Jan-Apr;6(1):11-4.

Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *J Pediatr Dent* 2004;14:417-24.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16;65(1-2):55-63.

Opačić-Galić V, Petrović V, Zivković S, Jokanović V, Nikolić B, Knežević-Vukčević J, Mitić-Ćulafić D. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):506-16.

Pires CW, Botton G, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, da Cruz IB, Sagrillo MR, Praetzel JR. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *J Endod*. 2015 Jul 14.

Preston RJ, San Sebastian JR, McFee AF. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat Res*. 1987 Oct;189(2):175-83.

Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J*. 2011;22(3):203-11.

Rao BS, Shanbhoge R, Upadhy D, Jagetia GC, Adiga SK, Kumar P, Guruprasad K, Gayathri P. Antioxidant, anticlastogenic and radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation. *Mutagenesis* Jul 2006;21(4):237-42.

Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:251-6.

Ruddle CJ. Three dimensional obturation: the rationale and application of warm gutta-percha with vertical condensation. *J Mass Dent Soc*. Summer 1994;43(3):15-8.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000. 35, 206-221.

Van Landuyt KL, Geebelen B, Shehata M, Furche SL, Durner J, Van Meerbeek B, Hickel R, Reichl FX. No Evidence for DNA Double-strand Breaks Caused by Endodontic Sealers. *J Endod* May 2012;38(5):636-41.

Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, Valera MC. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *Int Endod J*. 2017

L.A.B. Silva, L.U. Azevedo, A. Consolaro, F. Barnett, Y. Xu, R.A. Battaglini, P.S. Canadas, Katharina Morant Holanda de Olioveira, R.A.B. Silva. Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue. *Clin Oral Invest*. 2017

Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Alexandre A. Zaia, Ove A. Peters. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. Clin Oral Invest. 2017

Gleyce O. Silva, Bruno N. Cavalcanti, Tatiana R. Oliveira, Claudia V. Bin, Samira E.A. Camargo, Carlos H. R. Camargo. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. Clin Oral Invest. 2016

Jean Camps, Charlotte Jeanneau, Ikbale El Ayachi, Patrick Laurent, Imad About. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. Journal of Endodontics. Volume 41, Number 9, September 2015

Susanne Jung, Viktor Libricht, Sonja Sielker, Marcel R. Hanisch, Edgar Schafer, Till Dammaschke. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. Odontology. 21 June 2018

Marco Colombo, Claudio Poggio, Alberto Dagna, Maria-Vittoria Meravini, Paolo Riva, Federico Trovati, Giampiero Pietrocola. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. J Clin Dent. 2018; 10(2):e120-6

C.W. Pires, G. Botton, F. C. Cadoná, A.K. Machado, V. F. Azzolin, I.B.M. da Cruz, M. R. Sagrillo, J.R. Praetzel. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. International Endodontic Journal. 2015

Katerine Jahnecke Pilownic, Ana Paula Neutzling Gomes, Zhe Jun Wang, Luiza Helena Silva Almeida, Ana Regina Romano, Ya Shen, Anelize de Oliveira Campello Felix, Markus Haapasalo, Fernanda Geraldo Pappen. Physicochemical and Biological Evaluation of Endodontic Filling Materials for Primary Teeth. Brazilian Dental Journal. 2017

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI. Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Nov;106(5):e44-51

8. ANEXO

8. ANEXO

ANEXO – Parecer do comitê de ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial mutagênico de substâncias utilizadas na endodontia

Pesquisador: Nicole Gonçalves Lima

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 41659915.2.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.126.236

Data da Relatoria: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores adequaram a área temática do projeto, única questão que o CEP da FORP solicitou correção.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos descritos inicialmente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequação solicitada foi executada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0403

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP



Continuação do Parecer: 1.126.236

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 181ª Sessão Ordinária do CEP, realizada em 25/06/2015.

RIBEIRÃO PRETO, 26 de Junho de 2015

Assinado por:
Simone Cecílio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0403 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br