



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**NILTON CESAR NOGUEIRA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DA  
CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS UTILIZADOS NA  
TERAPIA PULPAR DE DENTES DECÍDUOS COM O USO DO  
TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE  
CAMUNDONGOS E DO ENSAIO COMETA EM LINFÓCITOS  
HUMANOS**

**NILTON CESAR NOGUEIRA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DA  
CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS UTILIZADOS NA  
TERAPIA PULPAR DE DENTES DECÍDUOS COM O USO DO  
TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE  
CAMUNDONGOS E DO ENSAIO COMETA EM LINFÓCITOS  
HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira  
Co-Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Emília Santos Pereira Ramos

Feira de Santana, BA  
2015

Dedico este trabalho a todos que buscam ser melhores na vida, para fazer a vida de alguém mais feliz. E aos que vivem incessantemente irradiando amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, pela vida e pela vontade incessante de viver.

À minha orientadora, Eneida Cerqueira, exemplo de mãe da ciência, exemplo de dedicação, de amor, sempre demonstrando força, incentivo e palavras afáveis, enternecedoras, mas com muito vigor.

À minha co-orientadora, Maria Emília, MA, por sua presença e praticidade.

À Profa. Suzie Vieira, pelo auxílio na concepção do projeto.

Ao laboratório de Genética Toxicológica, nas pessoas de Roberto, Maíza e Leonardo Menezes, pelo apoio incondicional.

A Orestes e Júnior, Juliana, também a toda equipe do Biotério, sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

À professora Claudia Pessoa e Bruno Soares, pelo tempo dedicado e pela parceria.

Ao Núcleo de Câncer Oral, nas pessoas do professor Márcio Campos, Jeane, Aline, Keu, Raniere e Thais, por cada momento dedicado a me ajudar.

À farmacêutica Adriana Barbosa, pelo auxílio nas diluições das substâncias utilizadas.

Aos colegas de trabalho, pelos “ajustes e remanejamentos”, em especial pela compreensão de Patrícia Bonin e Lúcia Mota.

Agradecimento especial à amiga e companheira, Valéria Freitas, por me estender a mão.

Aos amigos: Livia Freitas, Laizza Carvalho, Gabriela Martins, Tarsila, Gleicy, João Pedro, Matheus Pithon, por toda ajuda e compreensão.

A todos os meus amigos e familiares, que sempre torceram por mim e me apoiaram, em especial às Tates e mana Naná.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL À QUERIDA DOUTORA ENEIDA

"Ainda há sol, ainda há mar"

Não me lembro dessa rua em que você agora está morando, mas imagino uma ruazinha estreita do Quartier Latin, com um ou dois bistrôs, um açougue em que a carne de vaca é enfeitada com rosas de papel, uma loja de antiguidades, uma pequena livraria, uma venda de vinho e carvão, um hotel povoado de bolsistas africanos e estudantes suecos.

Não sei que lembrança você terá deste vago brasileiro, mas tenho a ilusão de pensar que lhe fará bem saber que muito, muito longe, além do mar, há um homem que esta manhã, na praia de espumas brilhantes, pensou em você, e pensou com ternura, e lembrou com saudade o seu riso claro e sua mecha de cabelos castanhos. Este homem é inútil e não pode lhe mandar nem um pouco deste sol para aquecer seu corpo nem um pouco deste vento sadio e limpo do mar para lavar o seu pulmão que respira esse ar confinado que o “chauffage” resseca, e a fumaça do cigarro vicia.

Mas guarde esta notícia, minha amiga: o mundo não é tão escuro e frio como lhe parece nesse momento; fique bem quieta e paciente, num canto da cama, vendo televisão ou ouvindo música e sabendo que logo haverá, também para você, dias de sol, cálidos e alegres, com espuma brilhando.

Mas, se você se erguer na cama e chegar lentamente até a janela para ver lá fora, pela vidraça embaçada, a rua escura e suja, e voltar ainda mais triste para a cama, pensa nesta notícia àtoa que eu lhe mando, e é tudo que eu lhe posso mandar:  
ainda há sol, ainda há  
mar e o vento do mar.

E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.

(Gonzaguinha)

## SIGLAS

AAPD – American Academy of Pediatric Dentistry  
CEM – Mistura enriquecida com cálcio  
CHO – Ovário de hamster chinês  
CHX - Clorexidina  
CTZ – Cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
GRT – Reação granulomatosa tecidual  
HCPA – Hidróxido de cálcio pró-análise  
KRI – Pasta com iodofórmio, mentol e paramonoclorofenol  
MMS – Metil metanosulfonato  
MN - Micronúcleo  
MTA – Agregado trióxido mineral  
MTT – Brometo de dimetil-difeniltetrazólio  
NCE – Eritrócito normocromático  
OZ – Óxido de zinco  
OZE- Óxido de zinco e eugenol  
PBS – Solução salina tamponada  
PCE –Eritrócito policromático  
PDL – Ligamento periodontal  
PGP – Pasta Guedes-Pinto  
PMCC – Paramonoclorofenol canforado  
RNA – Ácido ribonucleico  
EMS – Etil-metanosulfonato  
SHE – Células embrionárias de hamster sirianos  
XTT – Metoxi-nitro-sulfofenil –fenilamino -tetrazólio

## RESUMO

A terapia pulpar de dentes decíduos se constitui no último recurso de prevenção da perda dentária, mas, dentre os produtos empregados para tal, as denominadas pastas obturadoras, nenhum é considerado como ideal. O objetivo deste trabalho foi avaliar, com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongo e do ensaio cometa em linfócitos humanos, os efeitos citotóxicos e genotóxicos de quatro pastas obturadoras utilizadas nesta terapia: óxido de zinco, hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral e uma pasta iodoformada (pasta Guedes-Pinto). Para realização do teste de micronúcleo, camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, foram divididos em grupos de dez animais, que foram expostos às pastas obturadoras, administradas via intraperitoneal nas diluições de 1/10, 1/50, 1/500 e 1/1000. Ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo. Os controles negativos foram: dimetilsulfóxido (DMSO) para a pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco; e solução salina tamponada (PBS) para o hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral. Os animais foram sacrificados 24h e 48h após tratamento, a medula óssea foi extraída e foram analisados 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) de cada um dos animais, sob microscopia óptica (1000X) e em teste cego. A citotoxicidade foi avaliada pela relação PCE (eritrócito policromático) / NCE (eritrócito normocromático) em 200 eritrócitos/animal. Para o ensaio cometa, linfócitos humanos foram cultivados nas diluições de 1:500, 1:750, 1:1000 e 1:2000 das pastas obturadoras, durante 3h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizados dois controles positivos: metil-metanosulfonato (0,4µM) para o hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral, e doxorubicina (0,6 µM) para a pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco. Foram também dois os controles negativos utilizados: água destilada para o hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral, e DMSO para pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco. A identificação do cometa foi realizada sob microscopia de fluorescência (400X), sendo computados 100 deles em cada uma das três lâminas analisadas para cada droga teste. A análise estatística dos resultados do teste de micronúcleo foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros. Análise de variância, seguida do teste de Tukey, foram utilizados para avaliação da relação PCE/NCE obtida com os diferentes tratamentos e também para comparação das médias dos índices de danos ao DNA obtidos no ensaio cometa com o software Prisma versão 4.0. A ocorrência de micronúcleos foi significativamente maior nos animais tratados com a pasta Guedes-Pinto em todas as diluições testadas, nos dois tempos de sacrifício e também para os animais tratados com óxido de zinco e sacrificados 48h após tratamento, nas diluições 1:50; 1:500 e 1:1000. Efeitos citotóxicos destas pastas foram detectados nos animais sacrificados nos dois tempos. O hidróxido de cálcio P.A. e o agregado trióxido mineral não apresentaram efeitos citotóxicos nem genotóxicos. Os resultados obtidos com o ensaio cometa também apontaram para a genotoxicidade do óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto, e não do hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral. Estes resultados mostram a necessidade de reavaliação do uso do óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto e suscitam a realização de estudos adicionais avaliando a genotoxicidade e citotoxicidade destas pastas.

**Palavras-chave:** pastas obturadoras, teste de micronúcleo, ensaio cometa, genotoxicidade, citotoxicidade.



## ABSTRACT

Pulp therapy for deciduous teeth is the last resort for preventing tooth loss, but among the products used for this, i.e. so-called filling pastes, none is considered to be ideal. The objective of this study, using the micronucleus test on the bone marrow of mice and the comet assay on human lymphocytes, was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of four filling pastes that are used in this therapy: zinc oxide, calcium hydroxide P.A., mineral trioxide aggregate and an iodoform paste (Guedes-Pinto paste). To perform the micronucleus test, male Swiss mice (*Mus musculus*) were divided into groups of ten animals each: four groups were each exposed to one of the filling pastes, administered intraperitoneally at dilutions of 1/10, 1/50, 1/500 and 1/1000. Cyclophosphamide was used as the positive control. The negative controls used were the dilution vehicles: dimethylsulfoxide (DMSO) for the Guedes paste and zinc oxide; and phosphate-buffered saline solution (PBS) for the calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate. The animals were sacrificed 24 h and 48 h after the treatment. The bone marrow was extracted, in order to calculate the micronucleus occurrence rate in 1000 polychromatic erythrocytes (PCE) in each of the animals, under an optical microscope (1000 X), in a blinded test. Cytotoxicity was evaluated by determining the PCE/NCE (normochromatic erythrocyte) ratio in 200 erythrocytes/animal. For the comet assay, human lymphocytes were cultured in different dilutions of each of the filling pastes (1:500, 1:750, 1:1000 and 1:2000), for 3 h at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Two positive controls were used: methyl-methanesulfonate (0.4 µM) for the calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate; and doxorubicin (0.6 µM) for the Guedes paste and zinc oxide. Two negative controls were also used here: distilled water for the calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate; and DMSO for the Guedes paste and zinc oxide. Comets were identified by means of fluorescence microscopy (400 X), and 100 of them were counted on each of the three slides that were analyzed for each drug test. The statistical analysis on the results from the micronucleus test was performed using the conditional test for comparing proportions in situations of rare events. Analysis of variance, followed by the Tukey test, was used to assess the PCE/NCE ratio obtained from the different treatments and also to compare the means from the DNA damage indices that were obtained through the comet test, using the Prisma software, version 4.0. The micronucleus occurrence rate was significantly higher among the animals treated with Guedes paste, at all the dilutions tested and at both sacrifice times and also among the animals treated with zinc oxide and sacrificed 48 h after treatment at the dilutions of 1:50, 1:500 and 1:1000. Cytotoxic effects from these pastes were detected in the animals sacrificed at both times. Calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate did not present any cytotoxic or genotoxic effects. The results obtained from the comet assay also showed that zinc oxide and Guedes paste presented genotoxicity, whereas calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate did not. These results show that there is a need to reassess the use of zinc oxide and Guedes paste and provide encouragement for conducting additional studies to evaluate the genotoxicity and cytotoxicity of these pastes.

**Keywords:** filling pastes, micronucleus test, comet assay, genotoxicity, cytotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>32</b>
3.1	INTRODUÇÃO	34
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.3	RESULTADOS	38
3.4	DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS	48
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>54</b>
4.1	INTRODUÇÃO	56
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.3	RESULTADOS	59
4.3	DISCUSSÃO	60
	REFERÊNCIAS	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária e os traumatismos dentoalveolares podem provocar alterações irreversíveis na polpa dental (ALMEIDA et al., 2009; LOSSO et al., 2009), culminando em necrose, o que pode levar a processos infecciosos, cistos e tumores (REGEZI et al., 2000; NEVILLE et al., 2004; CAMARGO, L. et al., 2009; TANNURE et al., 2011). Nesta situação, a terapia pulpar configura-se como último recurso para a preservação dos dentes decíduos em condições funcionais até sua esfoliação fisiológica e é imprescindível para manter a integridade e saúde dos tecidos periapicais.

Convém ressaltar que, para obtenção do êxito na terapia pulpar, é necessário o adequado tratamento dos canais radiculares, através do preparo químico-mecânico, acompanhado de obturação hermética, o que é realizado utilizando drogas que não são isentas de riscos à saúde, vez que apresentam efeitos citotóxicos e atividade antimicrobiana variados, sendo consideradas irritantes dos tecidos pulpar e periapical (DE DEUS, 1992; LEONARDO, 2005; FUKS, 2008; AZEVEDO et al., 2009; LOURENÇO-NETO et al., 2013; AAPD, 2014).

Dentre os materiais obturadores, em se tratando dos dentes decíduos, os mais comumente empregados são as pastas de óxido de zinco com, ou sem, eugenol; a pasta iodoformada preconizada por Guedes-Pinto, Paiva e Bozzola (1981), também conhecida como pasta Guedes-Pinto, aquelas à base de hidróxido de cálcio e o agregado trióxido mineral (CUNHA, BARCELLOSS e PRIMO, 2005; MELLO-MOURA et al., 2007; GONÇALVES, 2010; ABUABARA et al., 2012; COSTA et al., 2012; MASSARA et al., 2012; LOURENÇO-NETO et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; ANTONIAZZI et al., 2015). Outras alternativas para estes materiais, a exemplo do sulfato férrico e da biodentina, foram propostas (NOWICKA et al., 2013; ROSSI et al., 2014; YILDIZ e TOSUN, 2014).

A pasta composta de óxido de zinco e eugenol foi o primeiro material obturador a ser recomendado para dentes decíduos, sendo ainda utilizada (BARJAFIDALGO et al., 2011; AAPD, 2014). No Brasil, a pasta Guedes-Pinto e aquelas à base de hidróxido de cálcio são as mais utilizadas, com perspectiva de maior uso do agregado trióxido mineral, em comparação aos produtos similares disponíveis no mercado brasileiro (MELLO-MOURA et al., 2007; AZEVEDO et al., 2009; PIVA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013).

Pastas à base de hidróxido de cálcio, com ou sem iodofórmio e silicone em sua composição, configuram-se como material de fácil aplicação e, conforme a literatura atual, não apresentam efeitos tóxicos aos sucessores permanentes, além de serem reabsorvidas um pouco mais rápido do que as raízes dos dentes decíduos, propriedade esperada para um material obturador ideal (TRAIRATVORAKUL e CHUNLASIKAIWAN, 2008; LACATIVA, LOYOLA e SOUSA, 2012), diferente da pasta óxido de zinco e eugenol, que é mais densa, apresenta pouca adesividade e reabsorção mais lenta quando extravasa pelo ápice (RAMAR e MUNGARA, 2010; PINTO et al., 2011; TANNURE et al., 2012).

A pasta Guedes-Pinto, constituída por Rifocort®, paramonoclorofenol canforado e iodofórmio, de acordo com Mello-Moura et al. (2007), em revisão de literatura, ainda é uma das mais utilizadas nas faculdades de Odontologia brasileiras. Os autores concluem, com base nesta revisão, que a referida pasta apresenta excelentes resultados clínicos e resultados satisfatórios em testes citotóxicos, histopatológicos e microbiológicos.

Não há, entretanto, consenso na literatura quanto ao melhor material a ser utilizado para a terapia pulpar de dentes decíduos e não são numerosos os estudos em que o potencial genotóxico dos produtos empregados nesta terapia foi avaliado, destacando-se entre eles os trabalhos de Hikiba et al. (2005), Hagiwara et al. (2006), Silva, G. et al. (2006), Ramos et al. (2008), Camargo, C. et al. (2009), Ding et al. (2010); Zeferino et al. (2010); Leite et al. (2012) e Naghavi et al. (2014).

Destarte, realizar estudos que avaliem a genotoxicidade dos produtos empregados na terapia pulpar reveste-se de considerável importância, dada a relação íntima entre mutagenicidade e carcinogenicidade. É fato reconhecido que o câncer é doença genética, resultante de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA e/ou genes que informam proteínas associadas aos processos de proliferação e diferenciação celulares (protooncogenes e genes supressores de tumor) ou, ainda, em genes relacionados à apoptose (BREIVIK, 2005; LOU et al., 2007; COLOMBO e RAHAL, 2009; MARCU e YEOH, 2009).

O estabelecimento do potencial genotóxico de produtos utilizados em crianças, por sua vez, assume uma importância ainda maior, dada a maior expectativa de vida que oportuniza, ainda mais do que no adulto, a ocorrência de

mutações adicionais, propiciando a transformação maligna que, na maioria das vezes, é um processo que ocorre em múltiplas etapas.

Neste contexto, o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos é considerado valiosa ferramenta na avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade de um dado agente. Este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências internacionais de registros de novas drogas, drogas estas que são lançadas no mercado mundial (MARZIN, 1997; ZEIGER, 1998; RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003; BONASSI et al., 2009).

Além do teste de micronúcleo, tem sido recomendado, concomitantemente a este, a realização do ensaio cometa, que é um método sensível e rápido, capaz de detectar danos que ocorrem no DNA em células individuais (OLIVE e BANÁTH, 2006).

Com o desenvolvimento do presente estudo, objetivou-se, com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos, investigar a genotoxicidade e a citotoxicidade de quatro pastas obturadoras frequentemente utilizadas na terapia pulpar de dentes decíduos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 PASTAS OBTURADORAS UTILIZADAS NA ODONTOPEDIATRIA**

Os produtos que integram as pastas obturadoras mais utilizadas, atualmente, na odontopediatria são o hidróxido de cálcio P.A.; óxido de zinco com, ou sem, eugenol, agregado trióxido mineral e a pasta Guedes-Pinto.

#### *Hidróxido de cálcio P.A. (HCPA)*

O hidróxido de cálcio é um pó branco, alcalino (pH 12,8) e pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/litro de água, à temperatura de 25°C). Trata-se de uma base forte obtida a partir da calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (TOLEDO et al., 2010, MOHAMADI e DUMMER, 2011; KIM e KIM, 2014).

As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila (SIQUEIRA e LOPES, 1999; BARRETO, LUISI e FACHIN, 2005; MOHAMMADI e DUMMER, 2011; KIM e KIM, 2014). Esses íons

cálcio podem reduzir a permeabilidade de novos capilares em tecido de granulação de dentes despolpados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular. A propriedade biológica de reparação tecidual é o resultado da ativação da fosfatase alcalina pela elevação do pH (entre 8,6 e 10,3) induzida pela dissociação iônica. Essa enzima tem a capacidade de induzir os íons fosfato a reagirem com os íons cálcio, formando precipitados de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), o que caracteriza o processo de mineralização (SIQUEIRA e LOPES, 1999; MOHAMMADI e DUMMER, 2011).

Por outro lado, a difusão dos íons hidroxila confere atividade antibacteriana e, quando ocorre no canal radicular, altera o metabolismo enzimático das bactérias, a partir da influência de um gradiente de pH existente na membrana citoplasmática (KIM e KIM, 2014). A propriedade antimicrobiana é traduzida pela perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana, pela inativação das enzimas bacterianas e pelo dano ao DNA bacteriano (SIQUEIRA e LOPES, 1999; MOHAMMADI e DUMMER, 2011). Esta propriedade pode ser mais efetiva se utilizado o hidróxido de cálcio em cápsulas (HANG et al., 2013).

Para ser utilizado como medicação intracanal, o hidróxido de cálcio é misturado a diversos veículos, os quais devem possibilitar sua dissociação iônica em íons cálcio e hidroxila. Tal dissociação poderá ocorrer de diferentes formas, grau e intensidade, dependendo do veículo e de outras substâncias que entrem na composição da pasta contendo hidróxido de cálcio (MOHAMMADI e DUMMER, 2011).

Uma das principais propriedades do hidróxido de cálcio é a sua biocompatibilidade com os tecidos pulpar e periapical (MOHAMMADI e DUMMER, 2011; LABBAN et al., 2014). Poggio et al. (2014), entretanto, ao compararem a biocompatibilidade do hidróxido de cálcio com o agregado trióxido mineral, observaram que os produtos à base desta pasta mostraram menos citotoxicidade e atividade antibacteriana maior.

#### Óxido de zinco (OZ)

O óxido de zinco é também conhecido como zinco branco ou alvaiade de zinco, flor de zinco, branco de zinco. É um pó finíssimo, leve, branco ou branco amarelado, inodoro e pH aproximado de 7,0 em suspensão aquosa 50g/L a 20°C (STANCKIEWICKZ et al., 2000).

O óxido de zinco associado ao eugenol (OZE), como já comentado, foi o primeiro material utilizado na terapia pulpar de dentes decíduos e, em pesquisa realizada em 1997, foi citado como o preferencial nos Estados Unidos (PRIMOSCH, 1997). De acordo com Queiroz et al. (2009), apresenta elevado potencial antimicrobiano e tende a ser reabsorvido mais lentamente que as raízes dos dentes decíduos (BARJA-FIDALGO et al., 2011).

Araújo et al. (2013) recomendam o uso do óxido de zinco em endodontia de dentes decíduos sem o eugenol, considerando os efeitos citotóxicos deste produto ao tecido pulpar e ligamento periodontal (ATSUMI, FUJISAWA e TONOSAKI, 2005; ANPO, SHIRAYAMA e TSUTSUI, 2011).

#### *Agregado trióxido mineral (MTA)*

O agregado trióxido mineral foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda, Califórnia, Estados Unidos. É um pó branco ou cinza, de fácil manipulação, composto de silicato tricálcico, silicato dicálcico, alumínio tricálcico, tetracálcio aluminoférrico, óxido de bismuto, óxido de cálcio e óxido de ferro (presente apenas no MTA cinza) (TESSARE et al., 2005; CAMILLERI e PITT-FORD, 2006; MOTA et al., 2010; PARIROKH e TORABINEJAD, 2010). Suas partículas são hidrofílicas, de modo que, na presença de umidade, formam um gel coloidal que se converte em estrutura sólida. Após hidratação, o MTA apresenta pH de 12,5, similar ao hidróxido de cálcio. É de baixa solubilidade e sua radiopacidade é superior à da dentina radicular (MOTA et al., 2010; PARIROKH e TORABINEJAD, 2010).

De acordo com Torabinejad e Parirokh (2010) os íons que o constituem, principalmente cálcio e fosfato, também são componentes dos tecidos dentais, propriedade que confere biocompatibilidade ao material (RIBEIRO et al., 2005a; CAMILLERI e PITT-FORD, 2006; LEE et al., 2012; KHEDMAT et al., 2014), identificada também mesmo quando em associação com outros produtos (CHEN et al., 2010; CHANG et al., 2014; KIM e SHIN, 2014; ASMANN et al., 2015).

O agregado trióxido mineral apresenta efeito antibacteriano (SHEYKHREZAI et al., 2008) e há relato de que também apresente efeito antifúngico (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010; SILVA et al., 2014). Tem sido utilizado em pulpotomias, capeamentos pulpares diretos, apicificações, apicogênese, perfurações radiculares e de furca, fraturas radiculares e retro-obturações (ROBERTS et al., 2008;

SRINIVASAN, WATERHOUSE e WHITWORTH, 2009; PARIROKH e TORABINEJAD, 2010).

As desvantagens do MTA incluem: longo tempo de presa, alteração da cor dos dentes e tecidos adjacentes, difícil inserção e supostos componentes tóxicos (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010).

#### *Pasta Guedes-Pinto (PGP)*

A pasta preconizada por Guedes-Pinto, Paiva e Bozzola (1981) é composta por partes iguais de paramonoclorofenol canforado (PMCC), Rifocort® e iodofórmio. O preparo desta pasta é feito no momento da sua utilização com a proporção de três partes visualmente iguais de seus componentes.

O iodofórmio (triiodometano) é um iodeto obtido através de uma reação de halogenação. É apresentado sob a forma de cristais de coloração amarelo-pálido e tem odor forte característico. É utilizado como antisséptico e agente anti-infeccioso de uso tópico. Provoca uma ação local sobre os tecidos, diminuindo a secreção e a exsudação; estimula a proliferação celular; tem poder antisséptico leve, porém de ação prolongada; decompõe-se lentamente à temperatura corporal; ativa a fagocitose de resíduos irritantes aos tecidos e é intensamente radiopaco (TOLEDO et al., 2010).

O Rifocort®, pomada de uso dermatológico, é uma associação de um corticosteróide, a prednisolona, com um antibiótico, a rifamicina (1,5 mg de rifamicina sódica e 5,0mg de 21-acetato de prednisolona por grama da pomada).

O paramonoclorofenol canforado, terceiro componente da pasta Guedes-Pinto, surgiu em 1929, quando Walkhoff associou cânfora ao paramonoclorofenol (35% paramonoclorofenol e 65% cânfora) com o objetivo de diminuir seu potencial irritante. É um produto líquido, solúvel em álcool, clorofórmio e éter, de cor branca ou levemente amarelado, com odor característico (NAGEM-FILHO et al., 2007).

De acordo com Chang et al. (2000), o uso deste material está fundamentado nas propriedades antissépticas do fenol, um germicida eficaz. É um potente agente antimicrobiano, com dupla ação conferida pelas propriedades antissépticas do fenol e do íon cloro, o qual é liberado lentamente.

Além de aumento da atividade antimicrobiana e diminuição de seu potencial de irritação (CHANG et al., 2000), a associação do paramonoclorofenol com a



cânfora ou com o furacin propicia maior poder de penetração do medicamento na dentina e ramificações do canal radicular (SILVA, M. et al., 2006).

Além da pasta Guedes-Pinto, outras formulações de pastas contendo iodofórmio têm sido utilizadas. Tais sejam: Pasta KRI (iodofórmio, mentol e pararamonoclorofenol, óxido de zinco, lanolina e timol), Pasta Maisto (iodofórmio, cânfora, mentol, paramanoclofenol), Pasta Endoflas (Sanor Lab, Miami/FL, com iodofórmio, óxido de zinco, hidróxido de cálcio, sulfato de bário, eugenol e paramonoclorofenol) e a Vitapex (Neo Dental International, Federal Way/WA) com hidróxido de cálcio e iodofórmio (CUNHA, BARCELOSS e PRIMO, 2005).

## 2.2 RESULTADOS CLÍNICOS, ACHADOS RADIOGRÁFICOS E HISTOPATOLÓGICOS OBTIDOS COM O USO DE PASTAS OBTURADORAS

Queiroz et al. (2011) avaliaram, em camundongos com implantes subcutâneos, a resposta inflamatória dos seguintes materiais obturadores: a) óxido de zinco e eugenol (OZE); b) Calen® (hidróxido de cálcio e polietileno glicol) associado ao óxido de zinco e, c) cimento Sealapex® (mistura de óxido de zinco, hidróxido de cálcio, trióxido de bismuto, sílica). Foram utilizados 102 camundongos distribuídos em 11 grupos, sacrificados em 7, 21 e 63 dias, para cada tratamento. Foi feita análise histológica tecidual com sistema de escore para formação de fibra colágena, espessura tecidual e infiltrado inflamatório. A análise foi realizada pela mensuração da área e espessura da reação granulomatosa tecidual (GRT). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais no que diz respeito ao GRT. Contudo, o Calen® associado ao óxido de zinco produziu infiltrado inflamatório um pouco menos severo ( $p < 0,05$ ) do que os outros materiais (Calen®/OZ < Sealapex® < OZE).

Silva et al. (2010) avaliaram a resposta apical e periapical em tecidos dentais de cachorro após obturação radicular com a) Calen® espessado com óxido de zinco; b) pasta Guedes-Pinto; c) óxido de zinco e eugenol e, d) solução salina estéril (controle). Após 30 dias, as amostras foram submetidas a processamento histológico. A avaliação histopatológica revelou que os animais tratados com a Calen® não apresentaram alterações teciduais, tendo a histologia revelado maior número de fibras colágenas e não ocorrido reabsorção dos tecidos mineralizados.

Nos animais tratados com a pasta Guedes-Pinto, infiltrado inflamatório e edemas leves, com discreta fibrinogênese e reabsorção óssea, foram observados. Os animais em que foi utilizado o óxido de zinco com eugenol mostraram alterações na região periapical e espessamento do ligamento periodontal com a presença de células inflamatórias e edema. Os autores concluíram que a pasta Calen® espessada com óxido de zinco apresentou a melhor resposta tecidual, constituindo, assim, o material obturador mais indicado para dentes decíduos com vitalidade.

A atividade antibacteriana de quatro materiais obturadores para dentes decíduos, óxido de zinco e eugenol (OZE), Calen®/óxido de zinco (Calen®/OZ), Sealapex® e EndoREZ® (óxido de zinco, sulfato de bário, dimetacrilato) foi avaliada *in vitro* por Queiroz et al. (2009) em cinco colônias de bactérias que são comumente encontradas em infecções endodônticas (*Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), usando o teste de difusão em agar. Pasta Calen, digluconato de clorexidina a 1% (CHX) e água destilada serviram como controles. Depois da incubação das placas a 37°C por 24h, o diâmetro das zonas de crescimento bacteriano foi mensurado em milímetros. Diferenças estatisticamente significativas entre as zonas de inibição do crescimento bacteriano produzidas pelos diferentes materiais contra os organismos-alvo foram observadas: OZE > Calen®/ ZO > Sealapex® > EndoREZ®.

Massara et al. (2012) avaliaram os resultados clínicos/radiográficos após utilização do hidróxido de cálcio no tratamento endodôntico em 33 dentes decíduos (com necrose pulpar, associada ou não à lesão periapical ou interradicular) de crianças na idade de um a 11 anos. Durante o preparo biomecânico, os dentes foram irrigados com hipoclorito de sódio a 1% e obturados com pasta L&C®, à base de hidróxido de cálcio. Foram realizados controles periódicos, por até 72 meses, até a esfoliação do decíduo e a irrupção do dente permanente sucessor. Os resultados mostraram que 97% dos dentes não exibiram sinais clínicos e radiográficos de lesões periapicais e interradiculares e padrões similares de rizólise entre os grupos teste e controle foram observados. Diante dos seus achados, os autores concluíram que o hidróxido de cálcio foi efetivo no tratamento endodôntico de dentes decíduos, não necessitando que seja associado a outros agentes antimicrobianos.

Pinto et al. (2011) compararam clínica e radiograficamente dentes decíduos necrosados secundariamente à trauma e obturados com óxido de zinco e eugenol (OZE) e Calen® espessado com óxido de zinco (Calen®/OZ) durante 18 meses.

Vinte e seis crianças foram avaliadas, num total de 31 dentes (15 do tratamento com OZE e 16 com Calen® OZ). O sucesso clínico foi avaliado pela ausência de dor, de mobilidade dentaria ou de fístula e o sucesso radiográfico pela remissão total, ou parcial, da periodontite apical, ausência de reabsorção patológica da raiz ou presença de formação de novo osso. Os resultados foram similares para os dois produtos, sugerindo que ambos podem ser usados com sucesso para o tratamento de canal de dentes decíduos.

Utilizando implante intra-ósseo no maxilar de porcos, Lacativa, Loyola e Sousa (2012) avaliaram o hidróxido de cálcio P.A., a pasta Guedes-Pinto e uma pasta composta por cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol (pasta CTZ). Trinta porcos *guinea* foram divididos em três grupos de igual tamanho, cada grupo tratado com uma destas pastas obturadoras. Dois implantes do mesmo material, por animal, foram colocados um em cada lado da sínfise mandibular. O período de observação foi de quatro e 12 semanas. Ao final da observação, os animais foram sacrificados e realizadas preparações para exame histológico. Com quatro semanas, o hidróxido de cálcio P.A. e a pasta CTZ induziram severa inflamação, levaram à necrose óssea, hemorragia e infiltrado inflamatório de neutrófilos. A pasta Guedes-Pinto induziu pouca ou nenhuma inflamação nas primeiras quatro semanas. Após 12 semanas de observação, as reações ao hidróxido de cálcio e à pasta Guedes-Pinto não estavam mais presentes ou eram muito discretas, apresentando um padrão geral de restabelecimento do tecido ósseo. Resposta inflamatória de moderada a severa foi observada com a pasta CTZ. A pasta Guedes-Pinto apresentou níveis de biocompatibilidade aceitáveis nas duas análises. A biocompatibilidade do hidróxido de cálcio foi considerada aceitável com 12 semanas e não houve biocompatibilidade para a CTZ.

Ramar e Mungara (2010) avaliaram clínica e radiograficamente três materiais obturadores: RCFill® (óxido de zinco e eugenol com iodofórmio), Metapex® (hidróxido de cálcio com iodofórmio) e Endoflass® (óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio com iodofórmio) por um período de nove meses. Um total de 96 molares inferiores de 77 crianças com idades entre quatro a sete anos foram estudados. Os resultados mostraram que os índices de sucesso para RCFill®, Metapex® e Endoflass® foram, respectivamente, 95,1%, 90,5% e 84,7%. A associação do hidróxido de cálcio com o óxido de zinco e eugenol e iodofórmio

apresentou a melhor cicatrização, melhor regeneração óssea e maior reabsorção do excesso de material dentro da raiz.

Trairatvorakul e Chunlasikaiwan (2008) compararam clínica e radiograficamente o óxido de zinco e eugenol e a pasta Vitapex® (hidróxido de cálcio, iodofórmio e óleo de silicone) em 54 molares decíduos inferiores de 42 crianças. A avaliação clínica e radiográfica foi feita aos seis e 12 meses decorridos do tratamento. Os autores observaram que aos seis e 12 meses, o óxido de zinco e eugenol apresentou sucesso de 48% e 85% e a Vitapex® 78% e 89%, respectivamente. A análise estatística destes resultados revelou que o Vitapex® agiu de modo mais rápido que o óxido de zinco e eugenol no período de seis meses ( $p=0,048$ ). Em 12 meses, os resultados foram similares para ambas as pastas.

### 2.3 TESTES DE AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE

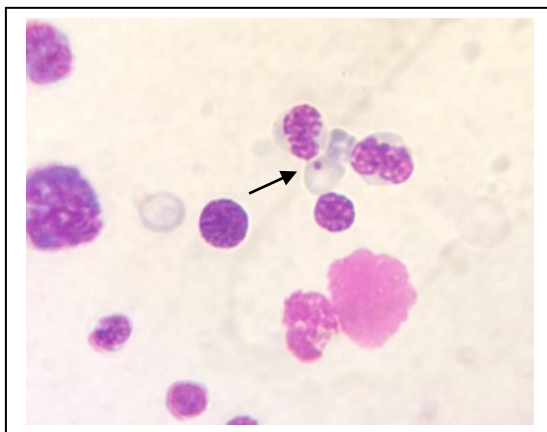
A relação entre danos genéticos e carcinogênese é fato estabelecido. Assim, a avaliação da ocorrência destes danos, quer sejam mutações de ponto ou alterações cromossômicas, é parte importante na prevenção do câncer. Vários são os testes atualmente disponíveis para tal avaliação (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003), entre eles, incluem-se o teste de micronúcleo (HOLLAND et al.; 2008; BONASSI et al., 2009) e o ensaio cometa (WONG et al., 2005, HARTMANN et al., 2003), ambos considerados ferramentas efetivas tanto no biomonitoramento de grupos expostos a mutágenos, quanto para a identificação do potencial mutagênico de uma dada substância ou de um dado agente físico (COLLINS, 2004; FAUST et al., 2004; PAIVA et al., 2011). Neste contexto, tanto o teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de roedores quanto o ensaio cometa em linfócitos humanos cultivados vêm sendo empregados (HEDDLE et al., 1983; HOLLAND et al., 2008; VASQUEZ et al., 2010, PAIVA et al., 2011; MEIRELES et al., 2013).

#### **2.3.1 Teste de Micronúcleo em Eritrócitos Policromáticos de Roedores**

O teste de micronúcleo se fundamenta na ocorrência de quebras cromossômicas ou falhas na ligação de cromossomos ao fuso, de modo que, o processo de maturação destas células, quando ocorre a expulsão do núcleo, esta

não se faz de modo integral, permanecendo no citoplasma estruturas resultantes destes eventos\_ os micronúcleos.

O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de roedores é utilizado para avaliação do potencial de um dado agente em induzir danos cromossômicos. Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falham em se ligar às fibras do fuso e, assim, não são incluídos no núcleo das células filhas (Figura 1). Detectam, portanto, a ação de agentes aneugênicos e de agentes clastogênicos. Em eritrócitos apresentam forma arredondada e medem cerca de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (RABELLO-GAY, 1991; RIBEIRO, 2003).



**Figura 1:** Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado (1000X), coloração pelo método de Leishmann

O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE), que são eritrócitos jovens, foi pioneiramente proposto por Schmid, Matter e Von Ledebur (MATTER e SCHMID, 1971; Von LEDEBUR e SCHMID, 1973; SCHMID, 1975) e posteriormente modificado por Heddle (1973).

Assim, na condução do teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, é fundamental conhecer a dinâmica de maturação da linhagem que origina os eritrócitos. A primeira célula da linhagem eritroblástica, formada a partir da célula indiferenciada, é o pró-eritroblasto. Este, após quatro divisões origina os eritroblastos, que passam por uma só divisão e dão origem às células nas quais o núcleo é expulso e que se diferenciam primeiramente em eritrócitos policromáticos e, posteriormente, em eritrócitos normocromáticos (NCE). Dois aspectos devem ser destacados na utilização deste teste: 1) Os eritrócitos policromáticos são ricos em

ácido ribonucleico (RNA) e, assim, apresentam a cor azulada quando as preparações são coradas pelo método de Leisham (RABELLO-GAY, 1991; RIBEIRO, 2003) e; 2) O período entre a formação do eritrócito policromático e sua diferenciação em eritrócito normocromático é de 10h a 24h de modo que seu cômputo deve ser feito antes que se esgote este período (RABELO-GAY, 1991; MACGREGOR et al., 1987).

O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos apresenta muitas vantagens, mas também algumas limitações. Tais sejam:

a) Vantagens

- Micronúcleos são observados em células de interfase, dispensando procedimentos de cultura;
- O teste é realizado a baixo custo;
- A análise é simples e as estruturas são facilmente identificadas;
- O teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos.
- Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através do cômputo da relação PCE/NCE (VILAR et al., 2008; BORGES et al., 2011).

b) Limitações

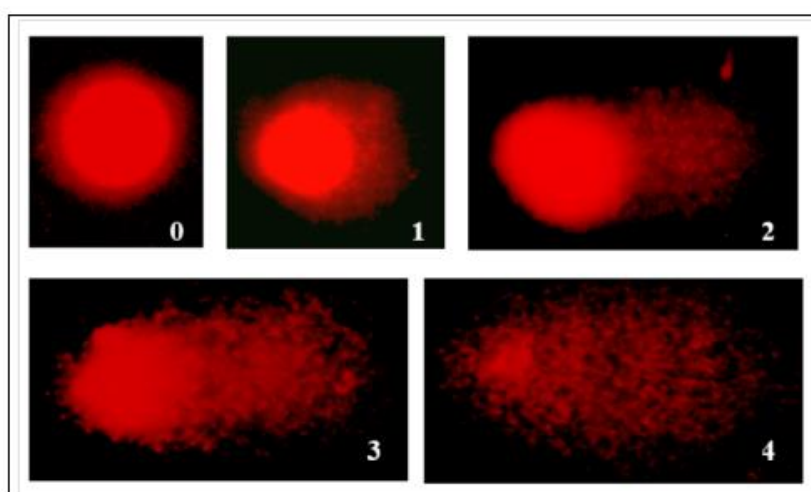
- Micronúcleos são observados apenas em células que passaram anteriormente por uma divisão;
- Eventos de não-disjunção mitótica não são detectados
- Quebras que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos não são expressas.

### **2.3.2 Ensaio cometa em linfócitos humanos**

O ensaio cometa é um teste que permite a identificação de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) de células individuais. Não identifica, portanto, mutações de ponto ou alterações cromossômicas, e sim lesões que atingem a molécula do DNA as quais, se não reparadas, resultam em mutações.

O método foi desenvolvido primeiramente por Ostling e Johanson (1984) e a formação da estrutura nele analisada\_ o cometa\_ se deve ao modo como o DNA está organizado no núcleo celular e ao comportamento desta molécula num gel de agarose. A compactação do DNA envolve primeiramente sua interação com

proteínas histônicas para formação do nucleossomo e culmina na formação de alças que aderem à matriz nuclear. Quando células embebidas em gel de agarose têm lisadas suas membranas e extraídas suas proteínas nucleares, o DNA, por ser o mais pesado dos componentes remanescentes, tende a ocupar o espaço anteriormente preenchido pela célula íntegra, ficando retido numa estrutura residual designada “nucleóide” (HARTMANN et al., 2003; OLIVE e BANATH, 2006). Após passar por uma corrente elétrica, por ter carga negativa, o DNA que sofreu quebra migra para o pólo positivo, dando origem ao cometa (Figura 2).



**Figura 2.** Perfis de danos ao DNA, mostrando as 5 categorias que indicam o grau de lesão sofrido pelas células. Onde: 0= sem dano (< 5%); 1= baixo nível de dano (5-20%); 2= médio nível de dano; 3= alto nível de dano (40-95%); 4=dano total (95%). Adaptado de Singh et al., 1988.

A metodologia original desenvolvida por Ostling e Johanson (1984) foi, em 1988, modificada por Singh *et al.* que introduziram a eletroforese alcalina para analisar alterações no DNA após tratamento com raios X ou água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Olive (1989), foi quem, com base na aparência do nucleóide apresentando DNA alterado, similar à de um cometa, denominou esta metodologia como *Comet Assay* (ensaio cometa). As modificações introduzidas por Singh et al (1988) e Olive et al (1989) propiciaram, além da identificação de quebras duplas de DNA, já visualizadas pela metodologia de Ostling e Johanson (1984), a identificação de quebras de cadeia de DNA simples, sítios álcis lábeis e crosslinks (HARTMANN et al., 2003).

As principais vantagens do ensaio cometa, segundo Tice et al. (2000), são:

- Apresenta grande sensibilidade e flexibilidade;
- O número de células para análise é pequeno;

- É realizado a baixos custos e em curto espaço de tempo;
- É de fácil aplicação.

#### 2.4 GENOTOXICIDADE DAS PASTAS OBTURADORAS

A avaliação do potencial genotóxico de produtos utilizados na terapia pulpar não tem registro amplo na literatura e em grande parte dos estudos em que foi investigado o ensaio cometa foi a metodologia empregada.

A genotoxicidade do agregado trióxido mineral (MTA) foi investigada com esta metodologia por diversos autores: Ribeiro et al. (2005a; 2006a); Braz et al. (2006); Silva, G. et al. (2006), Zeferino et al. (2010) e Naghavi et al. (2014).

No estudo de Ribeiro et al. (2005a), células de linfoma de camundongo (L5178Y) foram expostas ao MTA branco e ao MTA cinza nas concentrações finais de 1 µg/mL a 1000µg/mL, por 3h e a 37°C. Como controles negativo e positivo, as células foram expostas à solução salina fosfatada (PBS) e ao metil-metanosulfonato (MMS), respectivamente. Foram contados 50 cometas por lâmina (duas lâminas) e realizada análise automatizada. Efeitos genotóxicos não foram observados nas concentrações avaliadas, em nenhuma delas. Resultados similares foram obtidos por Ribeiro et al. (2006a) em estudo no qual células de ovário de hamster chinês (CHO) foram expostas ao MTA também nas concentrações finais de 1µg/mL a 1000µg/mL, por 1h e a 37°C. Foram contados 100 cometas (50 em cada uma de duas lâminas) e a análise foi automatizada. A análise estatística não revelou maior ocorrência de danos ao DNA em nenhuma das concentrações testadas.

A avaliação do potencial genotóxico do MTA com o uso do ensaio cometa através da exposição de linfócitos humanos, foi realizada por Braz et al. (2006) e Silva, G. et al. (2006). Braz et al. (2006) empregaram 4 diluições desta pasta, variando de 1µg/mL a 1000µg/mL, e como controles positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, o peróxido de hidrogênio e o PBS. Os linfócitos humanos foram expostos às diluições por 3h e a 37°C. Foram contados 50 cometas (25 em cada lâmina) e a análise foi automatizada. A análise estatística, feita com o uso do teste de Friedman, não revelou diferenças significativas em relação ao controle negativo para nenhuma das concentrações avaliadas. No estudo de Silva, G. et al. (2006), foi avaliado o potencial genotóxico do MTA cinza e MTA branco. Linfócitos humanos de dez voluntários foram tratados em diferentes concentrações,



de cada uma das duas formas de MTA, que variaram de 1µg/mL a 1000µg/mL, por 3h e a 37°C. O controle positivo empregado foi o peróxido de hidrogênio e o negativo o PBS. Da mesma forma que no estudo de Braz et al. (2006), foram contados 50 cometas (25 em cada lâmina) e a análise foi automatizada. A análise estatística, realizada também com o teste de Friedman, não revelou diferença significativa entre quaisquer das concentrações avaliadas e o controle negativo.

Zeferino et al. (2010) relataram resultados semelhantes aos descritos por Ribeiro et al. (2005a; 2006a). Nesse estudo, os autores empregaram o ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade do MTA branco em linhagem de fibroblastos murino (3T3-L1). As concentrações utilizadas variaram de 10µg/mL a 100µg/mL, e as células foram expostas por 1h, a 37°C. Como controles negativo e positivo, foram utilizados, respectivamente, PBS e MMS. Sob análise automatizada, foram computados 100 cometas (50 por lâmina).

Naghavi et al. (2014) avaliaram a genotoxicidade do MTA e de um cimento enriquecido com cálcio em várias composições (hidróxido, óxido, sulfato, silicato, carbonato e fosfato de cálcio – CEM) em fibroblastos de camundongos (linhagem L929) tratados com as concentrações de 0µg/mL a 1000 µg/mL (1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,25µg/mL, 15,6µg/mL, 7,8µg/mL e 0µg/mL) por 24h. O controle positivo empregado foi o MMS e o negativo o PBS. Foram contados 100 cometas (50 em cada lâmina) e os escores determinados por análise automatizada. A análise estatística, realizada com o teste de Friedman, revelou efeitos genotóxicos de ambas as substâncias testadas.

O ensaio cometa foi empregado também para avaliar a genotoxicidade do hidróxido de cálcio P.A., do paramonoclorofenol canforado, formocresol e do óxido de zinco (Ribeiro et al., 2004, 2006b; Ramos et al., 2008 e Brzovic et al., 2009).

No estudo de Ribeiro et al. (2004), células de linfoma de camundongo (L5178Y) foram expostas separadamente, por 1h e a 37°C, ao formocresol, paramonoclorofenol canforado (componente da pasta Guedes-Pinto) e hidróxido de cálcio diluído em água destilada nas concentrações de 20 µg/mL, 40 µg/mL e 80 µg/mL. MMS foi utilizado como controle positivo e água destilada como controle negativo. Por análise automatizada, 50 cometas por tratamento foram computados. A análise estatística, realizada com o teste de Kruskal-Wallis não apontou efeitos genotóxicos para nenhuma das substâncias testadas.

No estudo de Ribeiro et al. (2006b), foram também investigados os efeitos genotóxicos do formocresol, paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio, mas em células de ovário de hamster chinês (K-1). Do mesmo modo que o observado com as células L5178Y a análise estatística não revelou efeitos genotóxicos dessas substâncias.

Ramos et al. (2008) avaliaram a genotoxicidade do formocresol em linfócitos humanos. A cultura de linfócitos foi incubada em três diluições do formocresol (1:750, 1:1000 e 1:2000), por 45min a 37°C. Glicerina bi-destilada foi utilizada como controle negativo e doxorubicina (0,3µg/mL) como controle positivo. Foram contadas 50 células em cada uma das duas lâminas, com análise visual. A análise de variância seguida do teste de Tukey, utilizando o programa *Graphpad Prism* (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) não revelou maior ocorrência de danos ao DNA para qualquer das concentrações testadas.

Brzovic et al. (2009) avaliaram o potencial dos cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio ou de óxido de zinco (com ou sem eugenol) em induzirem danos ao DNA de linfócitos humanos. As culturas de células foram tratadas com 2µg, 4µg e 8µg de cada um dos materiais obturadores, por 48h a 37°C. Solução salina (NaCl a 0,9%) foi utilizada como controle negativo e MMS como controle positivo, por, pelo menos, 3h na concentração final de 3µg/mL. Foram contados 100 cometas para cada material testado e realizada análise automatizada. Os autores concluem que, sob as condições do estudo, as substâncias avaliadas apresentaram “biocompatibilidade aceitável em termos de genotoxicidade”.

A avaliação do potencial genotóxico de produtos utilizados na terapia pulpar dos dentes decíduos, utilizando o teste de micronúcleo, foi realizada por Ramos et al., (2008); Camargo, C. et al. (2009) e Bin et al. (2012).

No estudo de Ramos et al. (2008), foi avaliado o potencial genotóxico do formocresol, substância utilizada em pulpotomias de dentes decíduos. O teste de micronúcleo foi realizado em camundongos machos *Swiss*, com seis a oito semanas, pesando aproximadamente 30g. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22°C ± 2°C), umidade (~ 60%), ciclo de luz 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição. Os animais foram divididos em seis grupos de dez animais cada. O formocresol foi diluído em glicerina bi-destilada, sendo administrado uma única vez com injeção intraperitoneal, em um volume de 0,1 ml/10g de peso corporal. Os animais foram tratados com quatro diluições de

formocresol (1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000). O sacrifício dos animais foi feito por deslocamento cervical, 24h e 48h para remoção da medula óssea. Os controles negativo e positivo foram, respectivamente, glicerina bi-destilada e ciclofosfamida (20 mg/kg). A análise estatística mostrou aumento significativo na ocorrência de micronúcleos nos animais sacrificados 24h após tratamento apenas na maior diluição.

Camargo, C. et al. (2009) computaram a ocorrência de micronúcleos em fibroblastos de hamster chinês (linhagem celular V79) expostos a cimentos endodônticos que tinham em sua composição óxido de zinco ou hidróxido de cálcio. Foram contadas 1000 células por lâmina de duas culturas expostas a diferentes concentrações. Etil metanosulfonato (EMS) serviu como controle positivo. No mínimo, duas lâminas de dois experimentos independentes foram analisadas e as diferenças entre os valores médios dos números de MN foram analisadas usando o teste de Mann-Whitney. Apenas a exposição ao cimento que tinha hidróxido de cálcio na sua composição (Acroseal®) induziu aumento estatisticamente significativa na ocorrência de micronúcleos. Camargo, S. et al., ainda em 2009, com esta mesma metodologia, investigaram o potencial genotóxico do MTA cinza e do branco e de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco, de óleo de rícino e do metacrilato. Observaram que apenas o cimento à base do metacrilato apresentou ocorrência de micronúcleos significativamente maior quando comparado ao controle negativo.

Bin et al. (2012) avaliaram a genotoxicidade do MTA branco isoladamente e de dois cimentos endodônticos: um à base do MTA e outro à base de resina epóxica. Fibroblastos de hamster chinês (V79) foram expostos a diferentes diluições desses produtos (de 1:1 a 1:32) por 24h a 37°C. Os micronúcleos foram identificados sob microscopia óptica, sendo contadas 1000 células por lâmina. EMS foi utilizado como controle positivo e controle negativo foram culturas não tratadas. As diferenças entre os valores médios foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A exposição ao MTA branco não induziu aumento na ocorrência de micronúcleos em nenhuma das diluições, mas ocorrência significativamente maior destas estruturas em relação aos controles negativos foi observada nas células expostas aos cimentos endodônticos.

A genotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar tem sido também investigada pela análise de aberrações cromossômicas: Zarzar et al. (2003); Hikiba et al. (2005); Hagiwara et al. (2006); Brzovic et al. (2009) e Leite et al. (2012).

Zarzar et al. (2003) avaliaram a ocorrência destas aberrações em culturas de linfócitos obtidos a partir da amostra de sangue de 20 crianças, com cinco a dez anos de idade, que tiveram seus dentes tratados (pulpotomia) com formocresol. Foi coletado sangue duas vezes: a primeira anterior à pulpotomia e a segunda 24h após a administração do medicamento. A análise citogenética incluiu 200 metáfases e a análise estatística, feita com o teste de Wilcoxon, não revelou diferenças na ocorrência de aberrações cromossômicas no período pré e pós administração do tratamento. Os autores relatam efeito mutagênico do formocresol em uma criança o que para eles suscita dúvidas sobre a segurança do uso desta substância.

Aumento significativo na ocorrência de aberrações cromossômicas em células embrionárias de hamster (SHE) induzidas pelo carbol canforado, cresol, eugenol, formaldeído, água oxigenada e óxido de zinco foi descrito Hikiba et al. (2005), mas não para o iodofórmio. Hagiwara et al. (2006), avaliando o paraclorofenol, com o uso desta metodologia, não relataram maior ocorrência de aberrações cromossômicas. Porém, identificaram aumento na ocorrência destas aberrações com o hipoclorito de sódio, comumente empregado para o preparo biomecânico dos condutos radiculares previamente à realização da obturação.

Brzovic et al. (2009) investigaram a ocorrência de aberrações cromossômicas induzidas por cimentos à base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco e eugenol (2µg -32 µg) em cultura de linfócitos humanos. O controle negativo foi uma solução de cloreto de sódio (0,9%) e o positivo, a bleomicina (30 µg/mL). As culturas de células foram incubadas a 37°C e a avaliação das aberrações cromossômicas foi realizada 1h, 1d, 5d e 30d após incubação. Quinhentas metáfases foram avaliadas, computando o número de quebras cromossômicas e de cromátides, bem como o número de fragmentos acêntricos. Efeitos genotóxicos não foram induzidos pelas substâncias testadas.

Leite et al. (2012) avaliaram a genotoxicidade do formocresol de Buckley. Linfócitos humanos obtidos de 40 crianças de cinco a dez anos de idade foram cultivados. Amostras de sangue (6ml a 8ml) foram coletadas previamente ao tratamento e 24h após o tratamento pulpar com o formocresol. As culturas de linfócitos foram incubadas por 48h a 37°C. A análise citogenética foi realizada com o uso de microscópio óptico sob objetiva de 100X. Foram analisadas 200 metáfases por cultura/paciente. Apenas metáfases contendo 45 – 47 cromossomos foram analisadas. O teste de Wilcoxon e o teste de Mann Whitney foram utilizados na

análise dos resultados e revelaram que o formocresol induziu aumento significativo na ocorrência de aberrações cromossômicas em comparação ao controle negativo.

## 2.5 CITOTOXICIDADE DAS PASTAS OBTURADORAS

A citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar tem sido amplamente investigada, sendo mais comumente empregados para esta avaliação o teste de exclusão azul de tripan (RIBEIRO et al., 2004, 2005a; SILVA, G. et al., 2006; CORREA et al., 2009; ZEFERINO et al., 2010), o método de redução MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (HUANG et al., 2002; CERQUEIRA et al., 2009; DING et al., 2010; BIN et al., 2012; NAGHAVI et al., 2014) e o ensaio colorimétrico XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazólio) (PETEL et al., 2013). Em nenhum dos trabalhos relacionados a pastas endodônticas para os dentes decíduos, foi realizada a avaliação da citotoxicidade pela relação PCE/NCE.

A citotoxicidade do agregado trióxido mineral (MTA) foi investigada por Silva, G. et al. (2006), Ding et al. (2010), Zeferino et al. (2010), Bin et al. (2012) e Naghavi et al. (2014).

Silva, G. et al. (2006) avaliaram, com o uso do teste de exclusão azul de tripan, a viabilidade de linfócitos humanos expostos ao MTA em suas duas formas: cinza e branco. A viabilidade pós-exposição dos linfócitos foi de 75%. Zeferino et al. (2010), com o emprego do mesmo teste, mas em fibroblastos de roedores (linhagem 313-L1), também não relataram efeitos citotóxicos do MTA branco.

Empregando o Ensaio MTT, Ding et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade, além do MTA branco, do silicato de cálcio. A viabilidade de células de osteossarcoma humano (linhagem MG63) não foi significativamente alterada por nenhuma das substâncias testadas. Bin et al. (2012), com o uso também do Ensaio MTT, avaliaram a citotoxicidade do agregado trióxido mineral branco isoladamente e de dois cimentos endodônticos: um à base do agregado trióxido mineral e outro à base de resina epóxica. Fibroblastos de hamster chinês (V79) foram expostos a 200µL das substâncias testes em diversas diluições (de 1:1 a 1:32). A viabilidade celular do MTA branco permaneceu acima de 50% em todas as diluições. O cimento à base da resina epóxica, entretanto, induziu citotoxicidade intermediária sendo diluição-dependente, seguido do cimento à base do MTA, com maior citotoxicidade.

Naghavi et al. (2014), fazendo uso também do ensaio MTT, compararam em fibroblastos de camundongos (linhagem L929) a citotoxicidade do MTA com a de um cimento enriquecido com cálcio em várias composições (hidróxido, óxido, sulfato, silicato, carbonato e fosfato de cálcio). Não foram detectadas diferenças entre os produtos testados, nenhum dos dois tendo alterado significativamente a viabilidade das células.

Além do MTA, esses testes têm sido empregados para avaliar a citotoxicidade do hidróxido de cálcio P. A. (HCPA), de cimentos endodônticos com este produto, do óxido de zinco (com ou sem eugenol), de cimentos à base do óxido de zinco, do paramonoclorofenol e do iodofórmio (HUANG et al., 2002; RIBEIRO et al., 2004; 2005b; CAMARGO, S. et al., 2009; CORREA et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2009; PETEL et al., 2013).

O teste de exclusão azul de tripan foi empregado por Ribeiro et al. (2004) para avaliar a citotoxicidade do paramonoclorofenol e do hidróxido de cálcio em células de linfoma de camundongos (linhagem L5178Y) e fibroblastos humanos. Um preparado de 10ul da solução do corante, a 0,05% em água destilada, foi misturado a 10ul de cada uma das suspensões celulares por 20min. As células inviáveis foram observadas na coloração azul e duzentas células foram contadas por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à viabilidade das células expostas aos produtos testados, a qual foi de aproximadamente 90%  $\pm$ 5%. Em estudo com a mesma metodologia, avaliando esses mesmos produtos, mas em células de ovário de hamster chinês (CHO), Ribeiro et al. (2005b) observaram 95% de viabilidade dessas células.

Correa et al. (2009), com uso também do teste de exclusão azul de tripan avaliaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos à base de resina epóxica (AH Plus®), de óxido de zinco e eugenol (Fill Canal®) e de hidróxido de cálcio (L&C®) em monócitos de indivíduos com leucemia aguda (linhagem THP-1). Os extratos dos cimentos foram utilizados nas concentrações: 0,0001%, 0,001%, 0,01%, 1%, 10% e 100%. Os resultados mostraram que extratos brutos dos cimentos AH Plus® e Fill Canal® mataram 90% das células versus 36% de mortes provocadas pelo L&C®. Na concentração de 10%, o cimento AH Plus® ainda se manteve citotóxico.

Huang et al. (2002), através do ensaio MTT, avaliaram a citotoxicidade dos produtos AH26® e AHPlus® (à base de resina epóxica), Canals®, Endometasona® e N2 (cimentos à base de óxido de zinco e eugenol) e Sealapex® em células PDL de

pré-molares saudáveis e células da linhagem V79 de fibroblastos pulmonares de hamster chinês. Os extratos dos cimentos foram eluídos no meio de cultura por um, dois, três e sete dias. Os resultados mostraram que os cimentos à base de resina epóxica, óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio foram citotóxicos às duas culturas de células utilizadas: N2® > Endometasone® > AH26® > AHPlus® > Canals® > Sealapex®.

Cerqueira (2009), também com o uso do Ensaio MTT, avaliaram a citotoxicidade da pasta Guedes-Pinto (PGP), da pasta OZE, do Calen (produto com hidróxido de cálcio em sua composição) e do Calen® com paramonoclofenol canforado (Calen® PMCC®) em fibroblastos da polpa humana dentária. Os extratos brutos destas pastas foram testados nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. A avaliação foi realizada com 24h, 48h e 72h. A análise estatística dos resultados mostrou que todas as pastas foram significativamente citotóxicas na maior concentração, mas a OZE apresentou tal efeito em todas as concentrações.

Em um único estudo foi avaliada a citotoxicidade de um cimento endodôntico que continha o iodofórmio (PETEL et al., 2013). Neste estudo, macrófagos (RAW 2647) e células epiteliais (RKO) foram expostos a este produto nas diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024). O Ensaio colorimétrico XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5- [(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazólio) foi empregado para esta avaliação. Os autores relataram efeitos citotóxicos deste produto nas quatro maiores concentrações testadas.

Do exposto é possível concluir que, embora muitos estudos apontem para a inocuidade do MTA e do hidróxido de cálcio P.A., estudos adicionais avaliando a genotoxicidade e citotoxicidade destas e, principalmente, de outras pastas obturadoras se fazem necessários para que seu uso possa ser considerado seguro.

### 3 CAPÍTULO 1

#### **Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade de pastas obturadoras empregadas na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*)<sup>1</sup>**

#### RESUMO

A terapia pulpar constitui-se no último recurso para preservação dos dentes decíduos. Os efeitos genotóxicos e citotóxicos de muitos dos produtos utilizados nesta terapia não estão, entretanto, bem estabelecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar, com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongo, efeitos citotóxicos e genotóxicos de quatro pastas obturadoras: óxido de zinco, hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral e pasta Guedes-Pinto. Camundongos Swiss, machos, foram divididos em grupos de dez animais, que foram expostas a cada uma das pastas nas diluições testadas de 1/10, 1/50, 1/500 e 1/1000, administradas via intraperitoneal (0,1ml/10g de peso). Ciclofosfamida foi o controle positivo e os controles negativos foram dimetilsulfóxido e solução salina tamponada. Cinco animais foram sacrificados, 24h e 48h após tratamento. O material foi processado de acordo com Schmid (1976) e micronúcleos computados em 1000 eritrócitos policromáticos, sob microscopia óptica e em teste cego. A citotoxicidade foi avaliada pela relação PCE (eritrócito policromático) / NCE (eritrócito normocromático) em 200 eritrócitos. Os resultados da análise de micronúcleos foram avaliados com o teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros. Análise de variância e teste de Tukey foram utilizados para avaliação da relação PCE/NCE. A ocorrência de micronúcleos foi significativamente maior nos animais tratados com a pasta Guedes-Pinto em todas as diluições testadas, nos dois tempos de sacrifício e também para os animais tratados com óxido de zinco e sacrificados 48h após tratamento, nas diluições 1:50; 1:500 e 1:1000. O hidróxido de cálcio P.A. e o agregado trióxido mineral não apresentaram efeitos genotóxicos nem citotóxicos. A genotoxicidade e citotoxicidade do óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto reveladas neste estudo suscitam a realização de estudos adicionais para subsidiar com segurança a reavaliação de seu uso.

Palavras-chave: pastas obturadoras, teste de micronúcleo, genotoxicidade, citotoxicidade, dentes decíduos.

---

<sup>1</sup> Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico Mutagenesis (anexo I)



## ABSTRACT

**Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of filling pastes used for pulp therapy on deciduous teeth using the micronucleus test on bone marrow from mice (*Mus musculus*)**

Pulp therapy is the last resort for preserving deciduous teeth. However, the genotoxic and cytotoxic effects of many products used in this therapy are not well established. The aim of this study was to use the micronucleus test on bone marrow from mice to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of four filling pastes: zinc oxide, calcium hydroxide P.A., mineral trioxide aggregate and Guedes-Pinto paste. Male Swiss mice were divided into four groups of ten animals, each exposed to one of the pastes, and were subdivided according to the dilutions tested: 1/10, 1/50, 1/500 and 1/1000 administered intraperitoneally (0.1 ml/10 g of weight). Cyclophosphamide was the positive control. The negative controls were dimethylsulfoxide and buffered saline solution. Five animals were sacrificed 24 h and five 48 h after the treatment. The material was processed in accordance with Schmid (1976) and micronuclei were counted in 1000 polychromatic erythrocytes (PCE), under an optical microscope in a blinded test. Cytotoxicity was evaluated using the PCE/normochromatic erythrocyte (NCE) ratio in 200 erythrocytes. The micronucleus analysis results were evaluated using the conditional test for comparing proportions in situations of rare events. Analysis of variance and Tukey's test were used to evaluate the PCE/NCE ratio. There was significantly greater occurrence of micronuclei in the animals treated with Guedes-Pinto paste at all the dilutions tested, at both sacrifice times. Greater occurrence of micronuclei was observed among the animals treated with zinc oxide and sacrificed 48 h after the treatment, at the dilutions 1:50; 1:500 and 1:1000. Calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate did not present any genotoxic or cytotoxic effects. The genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and Guedes-Pinto paste revealed in this study indicate that further studies are needed to support safely the reevaluation of its use.

Keywords: filling paste, micronucleus test, genotoxicity, cytotoxicity, deciduous teeth.

## Introdução

A cárie dentária, doença ainda de grande prevalência em várias regiões do mundo, pode provocar alterações irreversíveis na polpa dentária e levar à perda precoce dos dentes (1-3). Em decorrência do processo infeccioso produzido pelas bactérias causadoras da cárie, pode ocorrer necrose da polpa dentária e subsequente à esta o aparecimento de cistos e tumores (4-7).

Nesse contexto, a terapia pulpar torna-se imprescindível para manter a integridade e saúde dos tecidos periapicais, possibilitando a preservação dos dentes decíduos em condições funcionais até sua esfoliação fisiológica. Para obtenção do êxito neste tratamento, necessário se faz o adequado tratamento dos canais radiculares, através do preparo químico-mecânico, acompanhado de obturação hermética (8,9).

Dentre os produtos disponíveis para o processo de obturação em dentes decíduos, o óxido de zinco, com ou sem eugenol, as pastas iodoformadas, o hidróxido de cálcio pró-análise e o agregado trióxido mineral são os mais utilizados na prática odontológica (10-14)

Não há consenso, contudo, quanto ao melhor material a ser utilizado para esta terapia, e não são numerosos os estudos em que o potencial genotóxico e/ou citotóxico das pastas empregadas para obturação de dentes decíduos foi avaliado (15-20). Tal avaliação assume grande importância, dada a relação entre danos genéticos e câncer, doença que resulta de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA e/ou com genes que informam proteínas associadas aos processos de proliferação e diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor), ou com a apoptose (21-24).

O teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos é considerado valiosa ferramenta na avaliação da genotoxicidade de um suposto agente mutagênico (25,26). Micronúcleos são estruturas que resultam de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que por não se ligarem às fibras do fuso não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Revelam, portanto, a ocorrência de danos cromossômicos induzidos por agentes aneugênicos e clastogênicos. Este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética

Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências internacionais de registros de novas drogas, drogas estas que são lançadas anualmente no mercado mundial (26-29).

Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através do cômputo da relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) (30-32).

Apesar das muitas vantagens que este teste oferece, não há registro na literatura de sua aplicação objetivando avaliar os efeitos genotóxicos e/ou citotóxicos de pastas obturadoras. Tais efeitos foram assim avaliados apenas para o formocresol, substância usada em terapia pulpar conservadora (18).

Com o desenvolvimento do presente estudo objetivou-se, utilizando o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos, avaliar a genotoxicidade e a citotoxicidade de quatro pastas obturadoras frequentemente utilizadas na terapia pulpar de dentes decíduos: hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral, óxido de zinco e uma pasta iodoformada (pasta Guedes-Pinto,33).

## **Materiais e métodos**

A metodologia adotada teve como base para seu delineamento experimental o estudo de Ramos et al. (18), único estudo em que os efeitos genotóxicos de uma substância utilizada na terapia pulpar conservadora de dentes decíduos (pulpotomia) foram avaliados pelo teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

### *Substâncias Químicas*

Foram utilizadas três preparações de pastas obturadoras em suas formulações comerciais: agregado trióxido mineral (MTA® Angelus Soluções Odontológicas, Londrina-Brasil); hidróxido de cálcio P.A.® (Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil) e óxido de zinco (IRM® Dentsply, Petrópolis, Brasil). A pasta iodoformada, preconizada pelo Prof. Guedes-Pinto, Paiva e Bozzola (33), em consonância com a prática odontológica, foi preparada no laboratório a partir da mistura em partes iguais de paramonoclorofenol canforado (Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil), uma pomada composta

por rifamicina (0,15%) e prednisolona (0,5%) e iodofórmio (Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil). Ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina tamponada (PBS) como veículos de diluição e controles negativos.

#### *Animais e ambiente de experimentação*

A amostra foi constituída por 190 camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, com seis a oito semanas de idade (34), criados e mantidos no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas (cinco animais/gaiola), forradas com maravalha autoclavada, em ambiente controlado com temperatura de  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade em torno de 60%, ciclo de luz 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição (35).

#### *Grupos amostrais*

Os animais foram pesados, marcados e distribuídos aleatoriamente em grupos de dez. Cada grupo exposto a uma pasta teste foi subdividido em quatro subgrupos de dez animais, em função da diluição. Um grupo foi exposto à ciclofosfamida (controle positivo) e dois grupos constituíram os controles negativos estabelecidos pelo veículo utilizado para diluição das pastas teste: DMSO foi usado como controle dos grupos tratados com o óxido de zinco e a pasta Guedes, e o PBS como controle dos grupos tratados com hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral. Metade dos animais de cada grupo foi sacrificada 24h após tratamento e os restantes após 48h.

#### *Diluições e tratamentos*

As diluições das pastas obturadoras foram 1:10; 1:50, 1:500 e 1:1000. O veículo de diluição das pastas iodoformada e óxido de zinco foi o DMSO e para o agregado trióxido mineral e hidróxido de cálcio P.A., solução de PBS. A ciclofosfamida foi utilizada na dose de 50mg/kg. Em todos os animais, a quantidade da substância administrada (pastas obturadoras, ciclofosfamida, DMSO, PBS) correspondeu a 0,1ml para cada 10g de peso corpóreo (36).

### *Obtenção e preparo do material para análise*

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Seguindo o protocolo de Schmid (37), os fêmures foram retirados, limpos e as epífises proximais seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringa 5mL contendo 0,5mL de soro fetal bovino. A agulha da seringa foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo de centrifuga contendo 3mL de soro fetal bovino. Com uma pipeta Pasteur, o material foi homogeneizado e, em seguida, centrifugado a 1000rpm, por 5'. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado homogeneizado com auxílio de uma pipeta Pasteur. Uma gota da suspensão de células foi transferida para lâmina limpa e seca sendo em seguida realizado, com auxílio de outra lâmina, o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas para cada animal. As lâminas secaram *overnight* à temperatura ambiente. Após 24h, o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. As lamínulas foram montadas com entellan.

### *Análise de micronúcleo e da relação PCE/NCE*

A análise foi realizada em teste cego, utilizando microscópio óptico binocular, sob objetiva 100X. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram aqueles descritos por Ribeiro (36): as estruturas que foram consideradas micronúcleos eram arredondadas, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro dos eritrócitos jovens (PCE), identificados pela coloração azulada. Um total de 1000 PCEs foi analisado (34). Para avaliação da citotoxicidade foram computados, sob magnitude de 1000X, 200 eritrócitos, para determinar a relação PCE/NCE.

### *Análise estatística*

A análise estatística, referente à ocorrência de micronúcleos nos grupos controles e expostos foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros (38), que é um teste de significância alternativo ao teste de qui-quadrado, na linha do teste exato de Fischer e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada aberração cromossômica. Análise de variância, seguida do teste de Tukey, foi utilizada para avaliação da relação PCE/NCE obtida com as diferentes concentrações de cada uma das drogas.

### *Aspectos éticos da pesquisa*

A pesquisa atendeu aos Princípios Éticos publicados pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pelo Comitê de Ética com o Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo CEUA-UEFS 008/11 – Anexo II).

### **Resultados**

A Tabela I apresenta os resultados obtidos com os animais sacrificados 24h após tratamento com as pastas obturadoras, controles positivo e negativos. Note-se que para alguns tratamentos houve perda de animais. A análise estatística revelou maior ocorrência de micronúcleos entre os camundongos tratados com a pasta Guedes-Pinto em todas as quatro concentrações quando comparados aos camundongos tratados com DMSO. A ocorrência de micronúcleos não diferiu entre quaisquer das outras pastas testadas e respectivos controles negativos em qualquer das concentrações.

Na tabela II são apresentados os resultados obtidos com os animais sacrificados 48h após tratamento com as pastas obturadoras, controles positivo e negativos. A análise estatística revelou que, do mesmo modo como observado com os animais sacrificados 24h após tratamento, a ocorrência de micronúcleos entre os animais tratados com a pasta Guedes-Pinto, em todas as concentrações utilizadas, foi significativamente maior que a observada entre os animais tratados com DMSO. Resultado similar foi obtido para a pasta óxido de zinco nas três concentrações analisadas. Nenhuma diferença na ocorrência de micronúcleos entre os animais tratados com o hidróxido de cálcio P.A. ou com o agregado trióxido mineral e o controle negativo foi observada.

**Tabela I.** Ocorrência de micronúcleos em PCE de camundongos Swiss 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral, óxido de zinco, pasta Guedes-Pinto, controle positivo e controles negativos.

Sacrifício	Tratamento	PCE analisados	Micronúcleo	
			N	%
24h	Hidróxido de cálcio P.A.			
	1/50	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	1/500	5000	5 <sup>a</sup>	0,10
	1/1000	5000	5 <sup>a</sup>	0,10
	Agregado trióxido mineral			
	1/10	4000	7 <sup>a</sup>	0,17
	1/50	5000	10 <sup>a</sup>	0,20
	1/500	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	1/1000	5001	6 <sup>a</sup>	0,12
	Solução salina tamponada (PBS) (CN)	5000	7 <sup>a</sup>	0,14
	Ciclofosfamida (CP)	5000	27 <sup>b</sup>	0,54
	Pasta Guedes-Pinto			
	1/10*	5003	18 <sup>b</sup>	0,36
	1/50*	5000	15 <sup>b</sup>	0,30
	1/500*	4027	14 <sup>b</sup>	0,35
	1/1000*	4000	13 <sup>b</sup>	0,32
	Óxido de zinco			
	1/50	4011	9 <sup>a</sup>	0,22
	1/500	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	Dimetilsulfóxido (CN)	4000	3 <sup>a</sup>	0,07
	Ciclofosfamida (CP)	5000	27 <sup>b</sup>	0,54

Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (\*p <0,05)

**Tabela II.** Ocorrência de micronúcleos em PCE de camundongos Swiss 48 horas após tratamento com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral, óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto, controle positivo e controles negativos.

Sacrifício	Tratamento	PCE analisados	Micronúcleo	
			n	%
48h	Hidróxido de cálcio			
	1/10	4000	8 <sup>a</sup>	0,20
	1/50	5000	9 <sup>a</sup>	0,18
	1/500	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	1/1000	5000	3 <sup>a</sup>	0,06
	Agregado trióxido mineral			
	1/10	4000	5 <sup>a</sup>	0,12
	1/50	5000	11 <sup>a</sup>	0,22
	1/500	4000	5 <sup>a</sup>	0,12
	1/1000	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	Solução salina tamponada (CN)	5000	5 <sup>a</sup>	0,12
	Ciclofosfamida (CP)	5000	29 <sup>b</sup>	0,58
	Pasta Guedes-Pinto			
	1/10*	4001	14 <sup>b</sup>	0,35
	1/50*	4001	13 <sup>b</sup>	0,32
	1/500*	4000	16 <sup>b</sup>	0,40
	1/1000*	5001	17 <sup>b</sup>	0,34
	Óxido de zinco			
	1/50*	5000	16 <sup>b</sup>	0,32
	1/500*	4004	15 <sup>b</sup>	0,37
	1/1000*	4000	16 <sup>b</sup>	0,40
	Dimetilsulfóxido (CN)	5000	6 <sup>a</sup>	0,12
	Ciclofosfamida (CP)	5000	29 <sup>b</sup>	0,58

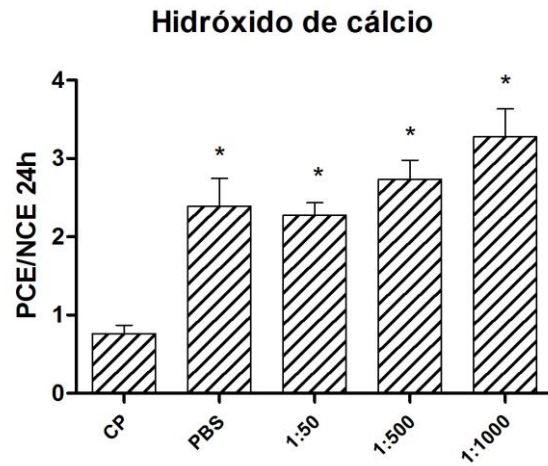
Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (\* p < 0,05)

Na Figura 1, são apresentados gráficos que ilustram as médias da relação PCE/NCE, calculadas para os animais tratados com as pastas obturadoras em cada uma das diluições testadas e sacrificados decorridas 24h desse tratamento.

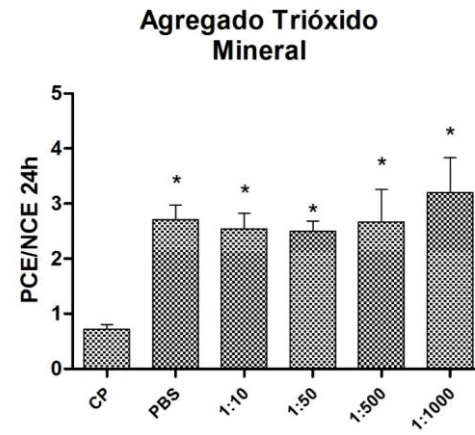


Diferenças significativas não foram observadas para o hidróxido de cálcio P.A. e o agregado trióxido mineral em relação ao controle negativo, em qualquer das diluições avaliadas. Óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto apresentaram efeito citotóxico em todas as diluições avaliadas, não diferindo do controle positivo. Resultados similares para todas as pastas em todas as diluições foram observados quando o sacrifício correu com 48h (Figura 2).

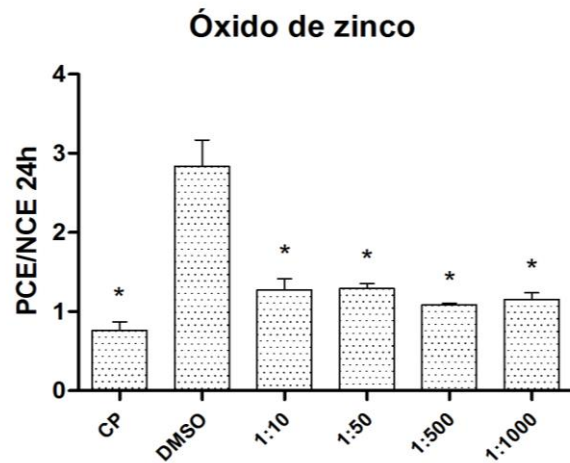
**Figura 1.** Gráficos das médias da relação PCE/NCE) obtidas nas primeiras 24h após tratamento com hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral, pasta Guedes-Pinto, óxido de zinco, controle positivo (CP) e controles negativos (PBS, DMSO).



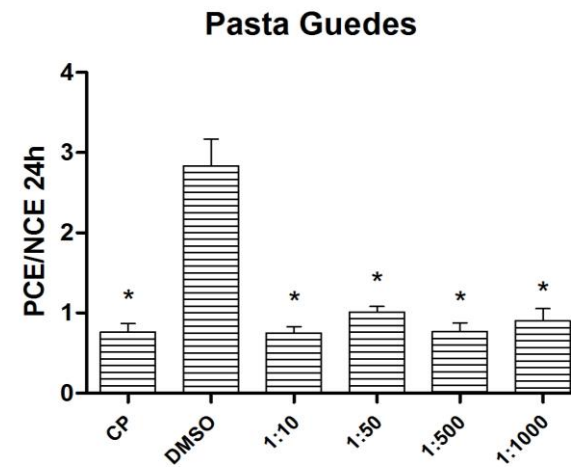
\* Diferente do controle positivo ( $P < 0,05$ )



\* Diferente do controle positivo ( $P < 0,05$ )



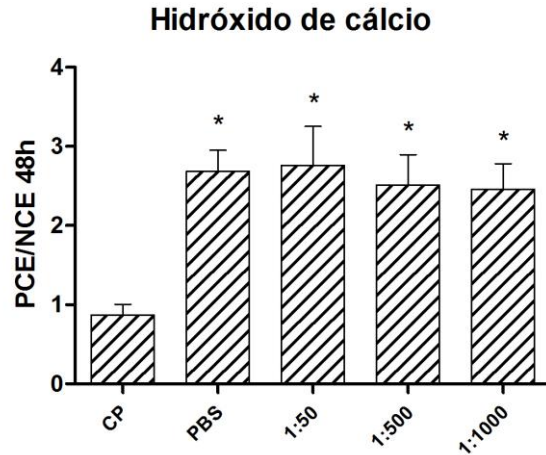
\* Diferente do controle negativo ( $P < 0,05$ )



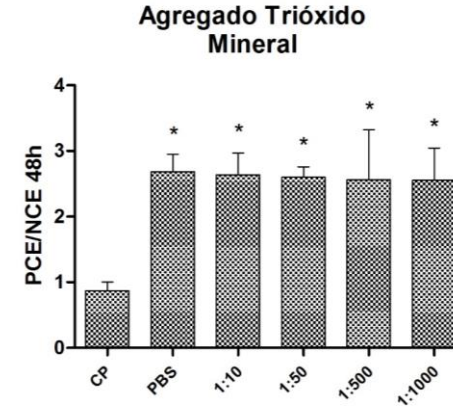
\* Diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ )

\* Diferente do controle negativo ( $P < 0,05$ )

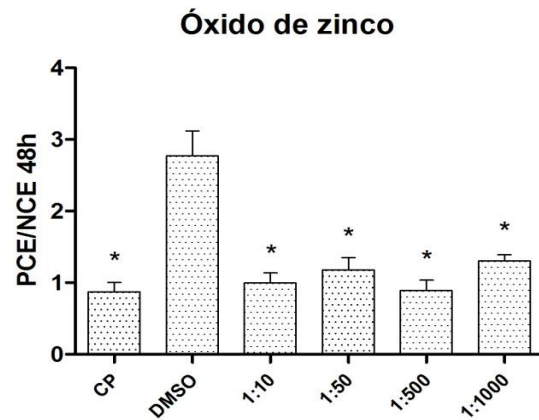
**Figura 2.** Gráficos das médias da relação PCE/NCE obtidas 48h após tratamento com hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral, pasta Guedes-Pinto, óxido de zinco, controle positivo (CP) e controles negativos (PBS, DMSO).



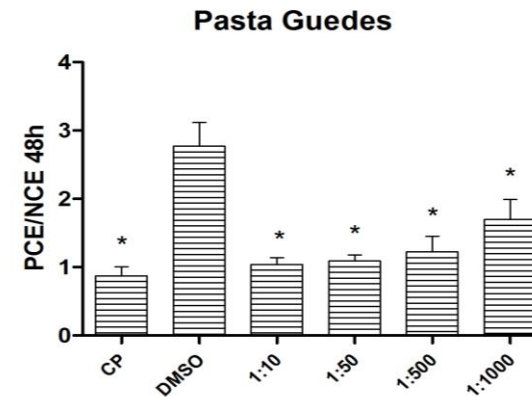
\* Diferente do controle positivo ( $P < 0,05$ )



\* Diferente do controle positivo ( $P < 0,05$ )



\* Diferente do controle negativo ( $P < 0,05$ )



\* Diferente do controle negativo ( $P < 0,05$ )

## Discussão

O estabelecimento do potencial genotóxico de produtos utilizados em crianças se reveste de especial importância dada a maior expectativa de vida que oportuniza a ocorrência de mutações, propiciando a transformação maligna que, na maioria das vezes, é um processo que ocorre em múltiplas etapas.

O registro na literatura de estudos em que o potencial genotóxico de produtos utilizados na terapia pulpar foi investigado com o uso do teste de micronúcleo se resume aos trabalhos de Ramos et al. (18); Camargo et al. (19) e Bin et al. (39), sendo que destes apenas Ramos et al. (18) empregaram metodologia similar à utilizada neste estudo. Esses autores avaliaram o potencial genotóxico do formocresol, substância utilizada em pulpotomias de dentes decíduos, e relataram aumento significativo na ocorrência de micronúcleos nos animais sacrificados 24h após tratamento, apenas na maior diluição (1:1000).

Os resultados obtidos no presente estudo apontam fortemente para o potencial genotóxico da pasta Guedes-Pinto e constituem o primeiro relato associando a indução, por esta pasta, de uma maior ocorrência de micronúcleos. Dada a escassez de estudos avaliando a genotoxicidade desta pasta, não é possível inferir qual ou quais de seus componentes induziria(m) tal efeito. Hikiba et al. (15) avaliaram a genotoxicidade do iodofórmio, um dos componentes da pasta Guedes-Pinto, através do computo da ocorrência de aberrações cromossômicas em células embrionárias de hamster chinês. Efeitos genotóxicos não foram relatados. O potencial do paramonoclorofenol, outro integrante da pasta Guedes-Pinto, em induzir aberrações cromossômicas e danos ao DNA foi investigado, respectivamente, por Hagiwara et al. (16) e Ribeiro et al. (51). Os resultados obtidos em ambos os estudos não apontaram para tal potencial.

Este estudo constitui também o primeiro relato de citotoxicidade da pasta Guedes-Pinto revelada pela avaliação da relação PCE/NCE. Empregando o Ensaio MTT, Cerqueira (40) descreveram efeitos citotóxicos desta pasta em fibroblastos de polpa dentária humana, mas apenas na maior concentração empregada (1:10). Petel et al. (41) fazendo uso do Ensaio colorimétrico XTT relataram, em macrófagos (RAW 2647) e células epiteliais (RKO), a citotoxicidade de um cimento à base do iodofórmio nas quatro maiores diluições (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) entre 11 testadas. Resultados obtidos por Ribeiro et al. (42,43) com o uso do teste de exclusão azul de

tripan não apontaram para a citotoxicidade do paramonoclorofenol. Estudos adicionais evidentemente se fazem necessários para consubstanciar este dado, vez que se fundamenta em um único estudo e, adicionalmente, não há registro do possível potencial citotóxico de outros componentes desta pasta.

Em relação ao óxido de zinco, a maior ocorrência de micronúcleos nos animais sacrificados 48h após tratamento, nas diluições de 1:50; 1:500 e 1:1000, corrobora, diferenças metodológicas à parte, os resultados obtidos por Hikiba et al. (15). Estes autores observaram em células embrionárias de hamster (*Syrian Hamster Embryo Cells*) uma maior ocorrência de aberrações cromossômicas nas culturas tratadas com esta substância. Camargo et al. (19), entretanto, não relataram maior ocorrência de micronúcleos em fibroblastos de hamster chinês (Linhagem V79) tratados com um cimento à base do óxido de zinco e Brzovic et al. (44) não relataram, em cultura de linfócitos humanos, maior ocorrência de aberrações cromossômicas induzidas por cimentos a base de óxido de zinco e eugenol.

Este é o único estudo em que a citotoxicidade do óxido de zinco foi revelada pela análise da relação PCE/NCE e em que este efeito foi investigado em pasta pura de óxido de zinco, isto é, sem associação com o eugenol. Quando associada a este produto, citotoxicidade foi apontada por Correa et al. (45) através do teste de exclusão azul de tripan em monócitos de indivíduos com leucemia aguda (linhagem THP-1) e, através do ensaio MTT, por Huang et al. (46) em células PDL de pré-molares saudáveis e células da linhagem V79 de fibroblastos pulmonares de hamster chinês, e por Cerqueira (40), em fibroblastos de polpa dentária humana.

Possíveis efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos do MTA não foram observados neste estudo, corroborando os resultados descritos por Bin et al. (39) que, em fibroblastos de hamster chinês (Linhagem V79), também não observaram maior ocorrência de micronúcleos após exposição ao MTA branco. Estes autores, entretanto, descreveram aumento significativo dessas estruturas nos fibroblastos tratados com um cimento à base do MTA, mas que continha também sílica, trióxido de bismuto e pigmentos, de modo que os resultados obtidos não podem necessariamente ser atribuídos a esta pasta.

A ocorrência de danos ao DNA induzidos pela exposição ao MTA tem sido avaliada com o uso do ensaio cometa, em diversos estudos realizados com diferentes tipos celulares e os resultados obtidos na maioria deles não apontaram para o potencial desta pasta em induzir tais danos (17, 43, 47-50). Naghavi et al.

(50), entretanto, descreveram maior ocorrência destes danos em fibroblastos de camundongos (linhagem L929) tratados por 24h com MTA nas concentrações de 1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL por 24h.

Do mesmo modo como relatado nos estudos de Silva et al. (17) e Zeferino et al. (49), que avaliaram, respectivamente, efeitos citotóxicos do MTA em linfócitos humanos e fibroblastos de roedores através do teste de exclusão azul de tripan tais efeitos não foram observados neste estudo. Resultados similares foram descritos por Ding et al.(20) e Naghavi et al. (50) com o uso do ensaio MTT. Bin et al. (39), entretanto, empregando esta mesma metodologia, relataram efeito citotóxico de um cimento à base do MTA. Há que ressaltar que nos estudos de Silva et al. (17), Zeferino et al. (49), Ding et al. (20) e Naghavi et al. (50) foi analisado o MTA isoladamente e no estudo de Bin et al. (39) o MTA integrava um cimento endodôntico que continha outros compostos, de modo que os resultados obtidos por estes autores não podem necessariamente ser atribuídos a esta pasta.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo na avaliação da genotoxicidade do hidróxido de cálcio P.A. fica dificultada pela escassez de estudos em que a ocorrência de danos cromossômicos induzidos por esta substância foi investigada. Camargo et al. (19) relataram maior ocorrência de micronúcleos em fibroblastos de hamster chinês (Linhagem V 79) expostos ao hidróxido de cálcio, mas este estava presente em um cimento endodôntico contendo também o ácido glicirrético, metenamina e bisfenol A, de modo que os efeitos genotóxicos descritos não podem ser a ele atribuídos. Efeitos genotóxicos do hidróxido de cálcio com o uso do ensaio cometa foram investigados por Ribeiro et al. (42,47) e Brzovic et al. (44). Maior ocorrência de danos ao DNA não foi observada em nenhum destes estudos.

Na maioria dos estudos em que efeitos citotóxicos do hidróxido de cálcio foram investigados (42,43,45), tais efeitos, do mesmo modo que o observado neste estudo, não foram revelados. Cerqueira et al. (40), contudo, descreveram estes efeitos em fibroblastos da polpa dentária humana expostos a duas pastas contendo, além do hidróxido de cálcio, várias outras substâncias. Assim, a citotoxicidade detectada não pode ser atribuída especificamente a qualquer dos componentes destas pastas.

Não foi encontrado registro na literatura de estudos analisando, com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de roedores, os efeitos genotóxicos

(avaliados pelo computo destas estruturas) e/ou os efeitos citotóxicos (inferidos pela relação PCE/NCE) das pastas que foram aqui investigadas, o que limitou a comparação dos resultados obtidos. Assim, resultados conflitantes, podem ser devidos às diferenças entre os sistemas biológicos investigados e/ou aos *endpoints* avaliados por diferentes metodologias.

Neste contexto, há que ressaltar algumas condutas adotadas neste estudo que diferiram do que poderia ser considerado o protocolo ideal. Em primeiro lugar, houve perda de animais, o que, em alguns casos, inviabilizou a análise para algumas das concentrações empregadas (três) e em outros levou à análise de um número menor de células do que o proposto na metodologia. Entretanto, para todos os resultados apresentados, um mínimo de 4000 eritrócitos foi analisado. As perdas dos animais que ocorreram nas maiores concentrações (1:10) poderiam ser atribuídas ao efeito tóxico da droga. Contudo, este efeito não foi observado para uma mesma droga nos dois tempos de sacrifício e para uma delas (o óxido de zinco) as perdas dos animais foram na menor concentração. É possível que tais perdas possam ser devidas a falhas no manejo dos animais quando da administração das drogas. Adicionalmente, os resultados obtidos com um único controle positivo foram os considerados para comparação de todas as pastas testadas em suas diferentes concentrações. Há que considerar que no protocolo que fundamentou a proposta metodológica deste estudo (Ramos et al. (18) os resultados também de um único grupo de controle positivo foram utilizados para comparação com aqueles obtidos em animais expostos a quatro diferentes concentrações e sacrificados em dois diferentes tempos. Tais considerações são válidas também para as comparações entre grupos expostos e controles negativos que, neste estudo, foram dois a depender do veículo de diluição usado para a substância testada.

Apesar destas limitações, a indução de danos ao DNA pela pasta Guedes-Pinto e pelo óxido de zinco, revelada neste estudo, suscita a realização de novas investigações, com estudos mais aprofundados, mas já constitui um primeiro alerta para sua não indicação ou para o uso mais controlado, principalmente porque o óxido de zinco integra produtos comumente utilizados na prática clínica odontológica, seja em provisórios dentários ou pastas profiláticas, usos outros que não a obturação dos canais radiculares.

Deve ser considerado também que estas pastas são inseridas no conduto radicular e por lá permanecem até a esfoliação do dente decíduo e sua remoção.

Além disso, parte do material pode extravasar pelo ápice do dente ficando em contato com os tecidos periapicais por um período bastante longo.

Pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco, tal como avaliadas neste estudo, apresentam efeitos genotóxicos e citotóxicos apontando para a necessidade de estudos adicionais que, com segurança, permitam estabelecer os riscos reais de seu uso.

## Referências

1. Barros, S.G., Castro-Alves, A., Pugliese, L.S. and Reis, S.R.A. ( 2001) Contribuição ao estudo da cárie dentária em crianças de 0-30 meses. *Pesq. Odontol. Bras.*, **15**, 215-22.
2. Almeida, T.F., Cangussu, M.C.T., Chaves, S.C.L., Silva, D.I.C. and Santos, S.C. (2009) Condições de saúde bucal de crianças na faixa etária pré-escolar, residentes em áreas de abrangência do Programa de Saúde da Família em Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Sau. Materno Infant.*, **9**, 247-252.
3. Losso, E.M., Tavares, M.C.R., Silva, J.Y.B and Urban, C.A. (2009) Severe early childhood caries: an integral approach. *J. Pediatr.*, **85**, 295-300.
4. Regezi, J.A., Joseph, A., Sciubba, J.J. (2000) *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 3. ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 475p, il. Tradução de: Oral pathology : clinical pathologic correlations.
5. Neville, B. W. (2004) *Patologia oral & maxilofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 798 p, il. Tradução de: Oral & maxillofacial pathology.
6. Camargo, L.B, Camhaji, F., Chelotti, A. Barbosa, J. and Raggio, D. P. (2009) Estudo histopatológico de lesões da furca de molares decíduos. *Pesq. Bras. Odontop. Clin. Int.*, **9**, 59-64.
7. Tannure, P.N., Fidalgo, T.K.S., Barcellos, R., Primo, L.G. and Maia, L.C. .(2012) Analysis of Root Canal Treated Primary Incisor After Trauma: Two Year Outcomes. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, **36**, 257–262.
8. Fuks, A.B. (2008) Vital Pulp Therapy with New Materials for Primary Teeth: New Directions and Treatment Perspectives. *J. Endod.*, **34**, 19s-24s.
9. AAPD – American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Reference Manual, **36**, 242-250. [2014]. (Available: [http://www.aapd.org/media/Policies\\_Guidelines/G\\_Pulp.pdf](http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/G_Pulp.pdf)).



10. Abuabara, A., Monguilhott, C. and Baratto-Filho, F. (2012) Review of pulp therapy in primary teeth. *RSBO*, **9**, 474-477.
11. Costa, L.E.D., Sousa, S.A., Serpa, E.B.M. and Duarte, R.C. (2012) Panorama do Ensino da Terapia Pulpar em Dentes Decíduos nos Cursos de Graduação em Odontologia. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.*, **12**, 425-431.
12. Massara, M.L.A., Tavares, W.L.F., Noronha, J.C., Henriques, L.C.F. and Ribeiro-Sobrinho, A.P. (2012) A eficácia do Hidróxido de Cálcio no Tratamento Endodôntico de Decíduos: Seis Anos de Avaliação. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.*, **12**, 155-159.
13. Lourenço-Neto, N., Fernandes, A.P., Marques, N.C.T., Sakai, V.T., Moretti, A.B.S., Machado, M.A.A.M., Abdo, R.C.C. and Oliveira, T.M. (2013) Terapia pulpar em dentes decíduos: possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. *Rev. Odontol. UNESP*, **42**, 130-137.
14. Pinheiro, H.H.C., Assunção, L.R.S., Torres, D.K.B., Miyahra, L.A.N and Arantes, D.C. (2013) Terapia Endodôntica em Dentes Decíduos por Odontopediatras. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.*, **13**, 351-360.
15. Hikiba, H., Watanabe, E., Barret, J.C. and Tsutui, T. (2005) Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in syrian hamster embryo cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 146-152.
16. Hagiwara, M., Watanabe, E., Barret, J.C. and Tsutsui, T. (2006) Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, **603**, 111-120.
17. Silva, G.N., Braz, M.G., Camargo, E.A., Salvadori, D.M.F. and Ribeiro, D.A. (2006) Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and White mineral trioxide aggregate. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.*, **102**, 50-54.
18. Ramos, M.E.S.P., Cavalcanti, B. C., Lotufo, L.V.C., Moraes, M.O., Cerqueira, E.M.M. and Pessoa, C. (2008) Evaluation of mutagenic effects of formocresol: detection of DNA-protein cross-links and micronucleus in mouse bone marrow. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.*, v. **105**, 398-404.
19. Camargo, C.H.R., Camargo, S.E.A., Valera, M.C., Hiller, K-A., Schmalz, G. and Schweikl, H. (2009) The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.*, v. **108**, 952-60.

20. Ding, S-J., Kao, C-T., Chen, C-L., Shie, M-Y and Huang, T-H. (2010) Evaluation of Human Osteosarcoma Cell Line Genotoxicity Effects of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Silicate Cements. *J. Endod.* **36**, 1158–1162.
21. Breivik, J. (2005) The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Sem. Cancer Biol.*, **15**, 51-60.
22. Lou J., He, J., Sheng, W., Jin, L., Chen, Z., Chen, S., Lin, Y., XU, S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mut Res.* 617: 104-110, 2007.
23. Colombo, J. and Rahal, P. (2009) Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Bras. Cancer.*, **55**, 165-174.
24. Marcu, L.G. and Yeoh, E. (2009) A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J. Cancer Res. Clin.* ..**135**, 1303-1314.
25. Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Baonassi, S, Zeiger, E., Knasmueller, S. and Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.*, **659**, 93-108.
26. Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zieger, E., Burgaz, S., Bolognesi, C., Holland, N., Thomas, P. and Fenech, M. (2009) State of art survey of the buccal micronucleus assay – a first stage in the HUMN<sub>XL</sub> project initiative. *Mutagenesis*, **24**, 295-302.
27. Marzin, D. (1997) The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutat. Res.*, **1-2**, 175-181.
28. Zeiger, E. (1998) Identification of Rodent Carcinogens and Noncarcinogens Using Genetic Toxicity Tests: Premises, Promises, and Performance. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **28**, 85-95.
29. Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. and Marques, E.K. (Org.). (2003) *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA, 355p.
30. Vilar, J.B., Ferreira, F.L., Ferri, P.H., Guillo, L.A. and Chen-chen, L. (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.*, **68**, 41-47.

31. Borges, F.F.V., Machado, T.C., Cunha, K.S., Pereira, K.C., Costa E.A., Paula, J.R. and Chen-Chen, L. (2011) Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *An Acad.Bras.Cienc.*, **85**, 955-963.
32. Meireles, J.R.C., Oliveira, S.V., Costa-Neto, A.O. and Cerqueira, E.M.M. (2013) Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). *Mutat. Res.*, **753**, 72–75.
33. Guedes-Pinto, A.C., Paiva, J.G., Bozzola, J.R. (1981) Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. *Rev. Assoc. Paulista Cir. Dent.*, **35**, 240-245.
34. Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R., Maontelesone Neto, R. (1991), Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo.
35. MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R. and Wild, D. (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.*, **189**, 103-112.
36. Ribeiro, L.R. (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Org.). Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, 355p
37. Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (ed.Hollaender,A.). Plenum Press, New York, **4**, 31-53.
38. Bragança-Pereira, C.A. (1991) *Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética*. In: Rabello-Gay, M.N., Rodrigues, M.A.L.R., Maontelesone-Neto, R. (editors). Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação, São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 113-121.
39. Bin, C.V., Valera, M.C., Camargo, S.E.A., Rabelo, S.B., Silva, G.O., Balducci, I. and Camargo, C.H.R. (2012) Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Sealers Based on Mineral Trioxide Aggregate. *J. Endodont.*, **38**, 495–500.
40. Cerqueira, D.F. (2009) *Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise de citotoxicidade e estudo in vitro da distribuição de proteínas da matrix extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental*

*humana*. 82p. (Doutorado em Ciências Odontológicas / Odontopediatria, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

41. Petel, R., Moskovitz, M., Tickotsky, N., Halabi, A., Golstein, J. and Hourri-Haddad, Y. (2013) Cytotoxicity and proliferative effects of Iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Arch. Oral Biol.*, **58**, 75-81.
42. Ribeiro, D.A., Marques, M.E.A., Salvadori, D.M.F. (2004) Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorofenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *J. Endodont.*, **30**, 593-596.
43. Ribeiro, D.A., Scolastici, C., Lima, P.L.A., Marques, M.E.A. and Salvadori, D.M.F. (2005) Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol. Oral Endod.*, **99**, 637-640.
44. Brzovic, Miletic, I., Zeljezic, D., Mladinic, M., Kasuba, V., Ramic, S. and Anic, I. (2009) In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int. Endod. J.*, **42**, 253-263.
45. Correa, G.T.B., Veranio, G.A.C., Silva, L.E., Hirata-Junior, R., Coil, J.M and Scelza, Z. (2009) Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a comercial calcium hydroxide paste on THP1 Cell Line by Trypan Blue Assay. *J.Appl.Oral Sci.*, **17**, 457-461.
46. Huang, F-M., Tai, K-W., Chou, M-Y and Chang, Y-C. (2002) 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.*, **35**, 153-158..
47. Ribeiro, D.A., Sugui, M.M., Matsumoto, M.A., Duarte, M.A.H., Marques, M.E.A.and Salvadori, D.M.F. (2006) 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. Oral Endod.*, **101**, 258-261.
48. Braz, M.G., Camargo, M.G.; Salvadori, D.M.F., Marques, M.E.A. and Ribeiro, D.A. (2006) Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide agreggate and portland cements. *J. Oral Rehabil.*, **33**, 234-239.
49. Zeferino, E.G., Bueno, C.E.S., Oyama, L.M. and Ribeiro, D.A. (2010) Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int.Endod.J.*, **43**, 843–848.

50. Naghavi, N., Ghoddusi, J., Sadeghnia, H.R., Asadpour, E. and Asgary, S. (2014) Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dental Mater. J.*, **33**, 64–69.
51. Ribeiro, D.A., Maques, M.E.A. and Salvadori, D.M.F. (2006) Antimicrobial endodontic compounds do not modulate alkylation-induced genotoxicity and oxidative stress in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.*, **102**, 32-36.

## Capítulo 2

### **Avaliação da genotoxicidade de materiais obturadores para dentes decíduos com o uso do ensaio cometa<sup>2</sup>**

#### RESUMO

A terapia pulpar de dentes decíduos, feita com produtos obturadores (pastas e cimentos), é empregada quando falham todos os recursos de prevenção da perda dentária. Apesar da diversidade de produtos disponíveis para tal, nenhum é considerado como “ideal” e o registro na literatura sobre sua genotoxicidade é conflitante. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, com o uso do ensaio cometa em linfócitos humanos, a genotoxicidade das pastas obturadoras: óxido de zinco, hidróxido de cálcio P.A., agregado trióxido mineral e Guedes-Pinto. Seguindo o protocolo de Singh et al. (1988), linfócitos obtidos de sangue periférico de doador saudável (3ml) foram cultivados em diferentes diluições de cada uma das pastas obturadoras (1:500, 1:750, 1:1000 e 1:2000), durante 3h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizados dois controles positivos: metil-metanosulfonato (0,4µM) para o hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral, e doxorrubicina (0,6 µM) para a pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco. Foram também dois os controles negativos: água destilada para o hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral, e DMSO para pasta Guedes-Pinto e óxido de zinco. A identificação do cometa foi realizada sob microscopia de fluorescência, sendo computados 100 deles em cada uma das três lâminas analisadas por droga teste. Um índice de danos foi estabelecido considerando o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Análise de variância, seguida do teste de Tukey, foram utilizados para comparação das médias dos índices de danos ao DNA, no software Prisma 4.0. Os resultados obtidos apontaram para a genotoxicidade do óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto, mas não do hidróxido de cálcio P.A. e agregado trióxido mineral. Estes resultados mostram a necessidade de reavaliação do uso do óxido de zinco e pasta Guedes-Pinto e suscitam a realização de estudos adicionais avaliando sua genotoxicidade.

**Palavras-chave:** pastas obturadoras, ensaio cometa, genotoxicidade, dentes decíduos

## ABSTRACT

### **Evaluation of the genotoxicity of filling materials for deciduous teeth using the comet assay**

Pulp therapy for deciduous teeth, done with filling products (pastes and cements), is used when all other methods for preventing tooth loss have failed. Despite the diversity of products available for this, none are considered “ideal”, with conflicting data in the literature regarding their genotoxicity. Thus, the objective of this study was to use the comet test on human lymphocytes to evaluate the genotoxicity of filling pastes: zinc oxide, calcium hydroxide P.A., mineral trioxide aggregate and Guedes-Pinto. In accordance with the protocol of Singh et al. (1988), lymphocytes obtained from the peripheral blood of a healthy donor (3 ml) were cultured in different dilutions of each of the filling pastes (1:500, 1:750, 1:1000 and 1:2000) for 3 h, at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Two positive controls were used: methyl-methanesulfonate (0.4 µM) for the calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate; and doxorubicin (0.6 µM) for the Guedes-Pinto paste and zinc oxide. There were also two negative controls: distilled water for the calcium hydroxide P.A. and mineral trioxide aggregate; and DMSO for the Guedes-Pinto paste and zinc oxide. Comets were identified using fluorescence microscopy and 100 of them were counted on each of the three slides analyzed per drug test. A damage index was established, taking into consideration the score pattern that had previously been determined from the size and intensity of the comet tail. Analysis of variance, followed by Tukey’s test, was used to compare the means of the DNA damage indices, in the Prisma 4.0 software. The results obtained show that zinc oxide and Guedes-Pinto paste present genotoxicity, but not calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate. These results show that there is a need to reassess the use of zinc oxide and Guedes-Pinto paste and provide encouragement for conducting additional studies to evaluate their genotoxicity.

Keywords: filling paste, comet assay, genotoxicity, deciduous teeth

## 1. Introdução

A cárie dentária e os traumatismos dentoalveolares podem levar a alterações pulpares irreversíveis que culminam na perda da unidade dentária. Diante destas alterações, a terapia pulpar constitui-se no último recurso para manutenção dos dentes decíduos em condições funcionais até sua esfoliação fisiológica e seu êxito depende do tratamento adequado dos canais radiculares, através do preparo químico-mecânico, acompanhado de obturação hermética [1-4].

Diversos são os materiais obturadores disponíveis, sendo mais comumente empregados na dentição decídua as pastas de óxido de zinco, com ou sem eugenol, as iodoformadas, aquelas à base de hidróxido de cálcio e o agregado trióxido mineral [5-7].

Apesar de a terapia pulpar de dentes decíduos ser utilizada há muitas décadas, não há consenso sobre qual a pasta obturadora que poderia ser considerada como material ideal. Para tal, uma pasta deve ser reabsorvível, apresentar radiopacidade, não interferir com o desenvolvimento do germe do dente sucessor e ser biocompatível com os tecidos periapicais [6,8,9].

Adicionalmente, espera-se de um material obturador ideal que não induza efeitos genotóxicos e/ou citotóxicos. Neste contexto, não há, também, consenso quanto a tais efeitos uma vez que não são numerosos os estudos que procederam tais investigações [10-18].

A avaliação do potencial de um dado produto em induzir genotoxicidade é de grande importância, dada a relação entre mutagênese e carcinogênese [19-22]. Dentre os testes disponíveis para tal avaliação inclui-se o ensaio cometa [23-25], empregado também para o biomonitoramento de indivíduos, ou populações, expostas a mutágenos [26,27]. Este ensaio detecta quebras simples e duplas na molécula de DNA induzidas por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes e pode ser realizado em células animais e vegetais, tanto *in vitro* como *in vivo* [28] e é uma das metodologias que mais frequentemente vem sendo empregada para avaliação da genotoxicidade de pastas obturadoras [12,16, 29-32]

O objetivo deste estudo foi avaliar, com o uso do ensaio cometa em linfócitos humanos, a genotoxicidade *in vitro* das pastas obturadoras hidróxido de cálcio P.A. (HCPA), agregado trióxido mineral (MTA), óxido de zinco (OZ) e a pasta Guedes-Pinto (PGP).



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Substâncias Químicas

Agregado trióxido mineral (MTA® Angelus Soluções Odontológicas, Londrina-Brasil.); hidróxido de cálcio P.A. (HCPA® -Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil) e óxido de zinco (IRM® – Dentsply, Petrópolis, Brasil) foram empregados em suas formulações comerciais. A pasta iodoformada, preconizada pelo Prof. Guedes-Pinto, Paiva e Bozzola (1981), conforme por eles recomendado, foi preparada no laboratório a partir da mistura em partes iguais de paramonoclorofenol canforado (PMCC® - Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil), pomada de rifamicina (0,15%) + prednisolona (0,5%) e iodofórmio (Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá-Brasil). Metil-metanosulfonato (MMS) ou doxorrubicina foram utilizados como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) ou água destilada como controle negativos.

### 2.2. Ensaio cometa

A metodologia empregada para detecção de danos ao DNA através do ensaio cometa seguiu o protocolo de Singh et al. [24], com algumas modificações [33].

#### 2.2.1. Coleta do material

Linfócitos humanos foram obtidos a partir da coleta de sangue periférico (10ml) retirado da veia de um doador voluntário, cuja seleção atendeu aos seguintes critérios: faixa etária entre 18 e 25 anos; bom estado clínico de saúde; não-fumante e não-etilista, além de não estar fazendo uso de medicamento.

#### 2.2.2. Células

Os linfócitos foram isolados a partir de três mililitros do sangue coletado, acrescido de 0,5ml de PBS, através de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) e foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 2% de fitohemaglutinina.

2.2.3. Diluição das amostras-teste e controles: Duas amostras-teste (OZ e PGP) foram diluídas em DMSO e duas (HCPA e MTA) em água destilada nas seguintes concentrações: 1:500, 1:750, 1:1000 e 1:2000. O composto alquilante metil-metanosulfonato (MMS), referência para HCPA e MTA foi utilizado na

concentração de 0,4µM. A concentração da Doxorubicina, controle positivo da PGP e do OZ, foi de 0,6µM. Ambos os produtos foram diluídos em DMSO.

#### 2.2.4. *Tratamento das culturas de linfócitos*

Os linfócitos foram expostos a cada uma das amostras-teste, em cada uma das quatro concentrações na proporção de 1µl a 4µl da substância teste para cada 200µl de meio de cultura, com incubação de 3h, em estufa.

2.2.5 *Eletroforese em gel de agarose e coloração*: Após o tratamento, as células foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (25V; 300mA) durante 20'. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20µg/mL).

2.2.6 *Análise do cometa*: A análise foi realizada sob microscópio de fluorescência, com magnitude de 400X, considerando o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa [26, 28, 34]. Foram computados, em cada uma de três lâminas, 100 cometas/lâmina classificados, por análise visual, em cinco categorias que representam a porcentagem de DNA na cauda do cometa indicado o grau de lesão sofrido pela célula, tais sejam: 0 = sem dano (< 5%); 1= baixo nível de dano (5-20%); 2= médio nível de dano; 3= alto nível de dano (40-95%); 4=dano total (95%).

### 2.3. *Análise Estatística*

Para calcular o índice de dano (ID), foi utilizada a fórmula:  $ID = \sum_{i=0}^4 ni \times i$ , em que ni é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Para análise estatística dos experimentos, foram utilizados a ANOVA e o teste de Tukey no software Prisma versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

### 2.4. *Aspectos Éticos da Pesquisa*

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará – Brasil, Protocolo COMEPE-UFC nº 281/09.

### 3. Resultados

A Tabela 1 apresenta os índices médios de danos ao DNA (ID) e respectivos erros padrão da média (EPM) calculados para as amostras-teste do agregado trióxido mineral (MTA) e hidróxido de cálcio P.A. (HCPA) e controles positivo e negativo: metilmetanossulfonato (MMS) e água destilada, respectivamente. A análise estatística não revelou diferenças significantes entre as médias obtidas nas diferentes concentrações das amostras teste e controle negativo, as quais foram significativamente menores que a calculada para o controle positivo.

**Tabela 1** - índices médios de danos ao DNA (ID), e respectivos erros padrão da média (EPM) calculados para o agregado trióxido mineral (MTA), hidróxido de cálcio P.A (HCPA), metilmetanossulfonato (MMS) e água destilada.

Amostras	Tratamento	ID ± EPM
Água destilada		5,66 ± 0,73 <sup>a</sup>
MMS	0,4 µM	178,75 ± 5,90 <sup>b</sup>
HCPA	1:500	6,83 ± 1,00 <sup>a</sup>
	1:750	8,33 ± 0,84 <sup>a</sup>
	1:1000	7,91 ± 0,99 <sup>a</sup>
	1:2000	6,50 ± 1,09 <sup>a</sup>
MTA	1:500	7,66 ± 0,87 <sup>a</sup>
	1:750	8,58 ± 0,89 <sup>a</sup>
	1:1000	7,58 ± 0,98 <sup>a</sup>
	1:2000	7,08 ± 0,94 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A Tabela 2 apresenta os índices médios de danos ao DNA (ID) e respectivos erro padrão da média (EPM) calculados para as amostras-teste do óxido de zinco (OZ) e pasta Guedes-Pinto (PGP) e controles positivo e negativo: doxorrubicina (DOX) e dimetilsufóxido (DMSO), respectivamente. A análise estatística revelou que as médias dos índices de danos ao DNA obtidas com os tratamentos das amostras teste (OZ e PGP) foi significativamente maior que a do controle negativo e não diferiram da média do controle positivo.

**Tabela 2** - índices médios de danos ao DNA (ID), e respectivos erros-padrão da média (EPM) calculados para o óxido de zinco (OZ), pasta Guedes-Pinto (PGP), doxorrubicina (DOX) e dimetilsufóxido (DMSO).

<b>Amostras</b>	<b>Tratamento</b>	<b>ID ± EPM</b>
<b>DMSO</b>	0,1% (v/v)	14,00 ± 0,57 <sup>a</sup>
<b>Doxorrubicina</b>	0,6 µM	145,7 ± 32,33 <sup>b</sup>
<b>Óxido de zinco</b>	1:500	218,5 ± 7,57 <sup>b</sup>
	1:750	204,0 ± 13,20 <sup>b</sup>
	1:1000	143,5 ± 12,14 <sup>b</sup>
	1:2000	104,7 ± 9,33 <sup>b</sup>
<b>Pasta Guedes-Pinto</b>	1:500	210,7 ± 30,57 <sup>b</sup>
	1:750	153,5 ± 26,12 <sup>b</sup>
	1:1000	123,3 ± 9,68 <sup>b</sup>
	1:2000	115,7 ± 12,93 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

#### 4. Discussão

Não há consenso na literatura quanto ao medicamento intracanal mais indicado em pulpectomias de dentes decíduos e as opções disponíveis atualmente são as pastas iodoformadas, o hidróxido de cálcio, o óxido de zinco com ou sem eugenol e o agregado trióxido mineral [6, 35], produtos, estes, objetos de investigação deste estudo, em decorrência do seu amplo uso em odontopediatria e dos resultados conflitantes de estudos abordando seu potencial genotóxico.

Neste estudo, para avaliação da genotoxicidade das pastas obturadoras selecionadas, foi empregado o ensaio cometa, por ser um método sensível e rápido, capaz de detectar lesões no DNA de células individuais, que podem ser medidas diretamente [27, 28]. Este método tem sido empregado com alguma frequência para avaliação da genotoxicidade de cimentos e pastas obturadoras de uso corrente na terapia pulpar.

Os resultados obtidos revelaram que o óxido de zinco, que foi testado isoladamente sem estar em associação com o eugenol, e a pasta iodoformada (pasta Guedes-Pinto) foram genotóxicos em todas as concentrações testadas. Não

há registro na literatura acerca da genotoxicidade destas pastas inferida por metodologia similar à empregada neste estudo.

Em relação ao óxido de zinco, Brzovic et al. [32] empregaram o ensaio cometa também em linfócitos humanos, mas os produtos obturadores testados foram cimentos à base do óxido de zinco com e sem eugenol e não a pasta pura como aqui testada, além do que os tratamentos foram diferentes tendo os autores empregado concentrações menores. Nestas condições, os autores concluíram que as substâncias avaliadas apresentaram “biocompatibilidade aceitável em termos de genotoxicidade”.

Resultados conflitantes sobre a genotoxicidade do óxido de zinco foram relatados em estudos em que os *endpoints* analisados foram danos cromossômicos [10,14,32]. Enquanto Hikiba et al. [10] observaram em células embrionárias de hamster uma maior ocorrência de aberrações cromossômicas nas culturas tratadas, Brzovic et al. [32] não relataram, em culturas de linfócitos humanos tratadas com cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, maior ocorrência destas aberrações. Avaliando danos cromossômicos, traduzidos por micronúcleos, Camargo et al. [14] não relataram maior ocorrência destas estruturas em fibroblastos de hamster chinês tratados com um cimento à base desta substância.

No que tange à pasta Guedes-Pinto, a comparação dos resultados obtidos neste estudo ainda se torna mais complicada, vez que não há registro de estudo, sob qualquer metodologia, avaliando a genotoxicidade desta pasta embora, isoladamente, alguns de seus componentes tenham sido avaliados [10,11,29,30].

Efeitos genotóxicos do iodofórmio, traduzidos na maior ocorrência de aberrações cromossômicas em células embrionárias de hamster chinês, não foram relatados por Hikiba et al. [10]. Resultados obtidos por Hagiwara et al. [11] e Ribeiro et al. [29,36], ao avaliarem, respectivamente, o potencial do paramonoclorofenol em induzir aberrações cromossômicas e danos ao DNA não apontaram para tal potencial.

A indução de danos ao DNA pela pasta Guedes-Pinto, revelada neste estudo, suscita a realização de novas investigações e constitui um primeiro alerta para sua indicação ou não.

Concorde com os resultados obtidos no presente estudo, Braz et al. [31] e Silva et al. [12] avaliando a genotoxicidade do MTA, com o uso ensaio cometa em linfócitos humanos, também não observaram maior ocorrência de danos ao DNA.

Esta pasta foi investigada por diversos outros autores utilizando o ensaio cometa em outros tipos celulares e, excetuando os resultados obtidos por Naghavi et al. [18], em nenhum deles efeitos genotóxicos foram identificados [12,16,30,31,37].

Do mesmo modo que neste estudo, efeitos genotóxicos do hidróxido de cálcio, traduzidos pela maior ocorrência de danos ao DNA em linfócitos humanos, identificados pelo ensaio cometa, não foram descritos por Brzovic et al. [32] investigando um cimento endodôntico à base desta substância.

Não há registro na literatura de outros estudos em que a genotoxicidade do hidróxido de cálcio foi investigada com o uso do ensaio cometa em linfócitos. Nos estudos de Ribeiro et al.[35] e Ribeiro et al. [38] o potencial desta substância em induzir danos ao DNA foi avaliado com o uso do ensaio cometa em células de linfoma de camundongo (L5178Y) e células de ovário de hamster chinês (K-1), respectivamente. Nestes tipos celulares, maior ocorrência de danos ao DNA também não foi descrita.

Assim, resultados obtidos com o uso do ensaio cometa revelam que o hidróxido de cálcio não é indutor de danos ao DNA. No que tange ao potencial do hidróxido de cálcio em induzir danos cromossômicos, Camargo et al. [14] relataram maior ocorrência de micronúcleos em fibroblastos de hamster chinês (Linhagem V 79) tratados com um cimento endodôntico à base desta substância, mas que continha adicionalmente ácido glicirrético, metenamina e bisfenol A. Assim, os efeitos genotóxicos observados não podem ser atribuídos isoladamente a um de seus componentes.

Do exposto, é permitido supor que sistemas biológicos diferentes avaliados em um mesmo teste, e diferentes *endpoints* avaliados por diferentes metodologias são fatores importantes que levam à resultados conflitantes na avaliação da genotoxicidade de um dado produto.

Há também que considerar que resultados discrepantes podem ser devidos a diferentes protocolos adotados para realização de um mesmo teste. Neste contexto, alguns aspectos metodológicos adotados no presente estudo necessitam ser comentados. Em primeiro lugar, a escolha de um só doador para obtenção de linfócitos foi fundamentada no estudo de Vijayalaxmi, Tice e Strauss [39] e também no protocolo adotado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, local onde foi desenvolvido o ensaio cometa. Sangue de um só doador foi também

analisado por Silva et al.[40] ao testarem a genotoxicidade de um extrato bruto de *Garcinia angostana L.* Vale ressaltar que nos estudos em que a genotoxicidade de pastas obturadoras foi avaliada em linfócitos humanos com o uso do ensaio cometa o sangue foi obtido de três doadores no estudo de Bzorvic et al. [32] e de dez doadores nos estudos de Silva et al. [12] e Braz et al. [31].

Outro aspecto metodológico a comentar é a atribuição dos escores aos cometas por análise visual e não por análise automatizada, a qual dirime a subjetividade da interpretação pessoal. Burlinson et al. [28] afirmam, contudo, que a análise automatizada é preferida, mas não se constitui numa exigência, vez que sistemas automatizados podem levar a diferenças quantitativas. Wong et al.[27] e Dhawan et al.[41] consideram válidas ambas as análises. Segundo Collins [42], uma avaliação fidedigna dos diferentes graus de danos ao DNA de acordo com a aparência do cometa não requer necessariamente programas de análise de imagem, vez que o olho humano pode ser facilmente treinado para tal identificação. Embora a análise automatizada integre a maior parte dos estudos atuais em que o ensaio cometa é a metodologia adotada, em diversos outros a análise visual foi a escolha [43-46].

Neste estudo, não foi possível realizar a análise automatizada porque não havia disponibilidade desta no local em que o ensaio foi desenvolvido. A análise dos cometas foi feita, contudo, em triplicata conforme recomenda Olive e Banáth [25], Hartmann et al. [26] e Wong et al. [27].

Resguardadas limitações deste estudo, os resultados obtidos são suficientes para que o uso da pasta Guedes-Pinto e do óxido de zinco como materiais obturadores de dentes decíduos seja revisto, embora estudos adicionais se façam necessários para comprovação dos dados obtidos.

## **Highlights**

Genotoxicidade de pastas obturadoras foi investigada

Óxido de Zinco e Pasta Guedes-Pinto induzem danos ao DNA

Hidróxido de Cálcio e Agregado Trióxido Mineral não apresentam genotoxicidade

## Referências

- [1] M.R. Leonardo, Endodontia - Tratamento de Canais Radiculares, fourth ed., Artes Médicas, São Paulo, 2005.
- [2] T.F. Almeida, M.C.T. Cangussu, S.C.L. Chaves, D.I.C. Silva, S.C. Santos, Condições de saúde bucal de crianças na faixa etária pré-escolar, residentes em áreas de abrangência do Programa Saúde da Família em Salvador, Bahia, Brasil, Rev. Bras. Saúde Mater. Infant. 9 (2009) 247-252.
- [3] E.M. Losso, M.C.R.Tavares, J.Y.B. Silva, C.A.Urban, Severe early childhood caries: an integral approach., J. Pediatr. 85 (2009) 295-300.
- [4] P.N.Tannure, T.K.S. Fidalgo, R. Barcellos, L.G. Primo, L.C. Maia, Analysis of Root Canal Treated Primary Incisor After Trauma: Two Year Outcomes, J. Clin. Pediatr. Dent. (2012) 36 257–262.
- [5] M.L.A. Massara, W.L.F. Tavares, J.C. Noronha, L.C.F. Henriques, A.P. Ribeiro-Sobrinho, A eficácia do Hidróxido de Cálcio no Tratamento Endodôntico de Decíduos: Seis Anos de Avaliação, Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.12 (2012) 155-159.
- [6] N.Lourenço-Neto, A.P.Fernandes, N.C.T. Marques, V.T. Sakai, A.B.S.Moretti, M.A.A.M. Machado, R.C.C. Abdo, T.M. Oliveira, Terapia pulpar em dentes decíduos: possibilidades terapêuticas baseadas em evidências, Rev. Odontol. UNESP 42 (2013) 130-137.
- [7] H.H.C. Pinheiro, L.R.S. Assunção, D.K.B.Torres, L.A.N. Miyahra, D.C. Arantes, Terapia Endodôntica em Dentes Decíduos por Odontopediatras, Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr. 13 (2013) 351-360.
- [8] A.B. Fuks, Vital Pulp Therapy with New Materials for Primary Teeth: New Directions and Treatment Perspectives, J. Endod., 34 (2008) 19s-24s.
- [9] AAPD – American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Reference Manual, 36 (2014) 242-250. (Available: [http://www.aapd.org/media/Polices\\_Guidelines/G\\_Pulp.pdf](http://www.aapd.org/media/Polices_Guidelines/G_Pulp.pdf)).
- [10] H. Hikiba, E. Watanabe, J.C.Barret, T. Tsutui, Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to indice chromosome aberrations in syrian hamster embryo cells, J. Pharmacol. Sci. 97 (2005) 146-152.



- [11] M. Hagiwara, E. Watanabe, J.C. Barret, T. Tsutsui, Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.* 603 (2006) 111-120.
- [12] G.N.Silva, M.G.Braz, S.E.A.Camargo, D.M.F.Salvadori, D.A. Ribeiro, Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and White mineral trioxide aggregate, *Oral Surg. Oral Med.Oral Pathol. Oral Radiol.Oral Endod.* 102 (2006) 50-54.
- [13].M.E.S.P. Ramos, B.C. Cavalcanti, L.V.C. Lotufo, M.O Moraes, E.M.M. Cerqueira, C. Pessoa, Evaluation of mutagenic effects of formocresol: detection of DNA-protein cross-links and micronucleus in mouse bone marrow, *Oral Surg. Oral Med.Oral Pathol. Oral Radiol.Oral Endod.* 105 (2008) 398-404.
- [14] C.H.R. Camargo, S.E.A. Camargo, M.C. Valera, K-A. Hiller, G. Schmalz, H. Schweikl, The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.* 108, (2009) 952-60.
- [15] S-J. Ding, C-T. Kao, C-L. Chen, M-Y. Shie, T-H Huang, Evaluation of Human Osteosarcoma Cell Line Genotoxicity Effects of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Silicate Cements, *J. Endod.* 36 (2010) 1158–1162.
- [16] E.G. Zeferino, C.E.S. Bueno, L.M. Oyama, D.A. Ribeiro, Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide, *Int.Endod.J.*, 43 (2010) 843–848.
- [17] A.C.G.L. Leite; A. Rosenblatt, M.S. Calixto, C.M. Santos, N. Santos, Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth, *Mutat.Res.* 747 (2012) 93 – 97.
- [18] N. Naghavi, J. Ghodusi, H.R.Sadeghnia, E. Asadpour, S. Asgary, Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells, *Dental Mater. J.* 33 (2014) 64–69.
- [19] J. Breivik, The evolutionary origin of genetic instability in cancer development, *Sem. Cancer Biol.* 15 (2005) 51-60.
- [20] J. Lou, J.He, W. Sheng, L. Jin, Z. Chen, S. Chen, Y. Lin, S. XU, Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay, *Mut Res.* 617 (2007) 104-110.
- [21] J. Colombo, P. Rahal, Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Bras. Cancer.* 55, (2009) 165-174.

- [22] L.G. Marcu, E. Yeoh, A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J. Cancer Res. Clin.* 135 (2009) 1303-1314.
- [23] O. Ostling, K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1984) 291–298.
- [24] M.P. Singh, M. McCoy, R.R. Tice, P. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [25] P.G. Olive, J. P. Banáth, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *Nat. Prot.* 1 (2006) 23-29.
- [26] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A.R. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18, (2003) 45-51.
- [27] V.W.C Wong, Y.T. Szeto, A. R. Collins, I.F.F. Benzie, The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3 (2005) 1-14.
- [28] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honmah, T. S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V.Thybaud, Y.Unom, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat.Res.*627 (2007) 31–35.
- [29] D.A. Ribeiro, C. Scolastici, P.L.A. Lima, M.E.A. Marques, D.M.F. Salvadori, D.M.F., 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. Oral Endod.*. 99 (2005) 637-640.
- [30] D.A. Ribeiro, M.M. Sugui, M.A. Matsumoto, M.A.H. Duarte, M.E.A Marques, D.M.F. Salvadori, 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. Oral Endod.* 101 (2006) 258-261.
- [31] M.G. Braz, M.G.Camargo, D.M.F.Salvadori, M.E.A. Marques, D.A.Ribeiro, Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and portland cements, *J.Oral Rehabil.* 33 (2006) 234-239.

- [32] V. Brzovic, I. Miletic, D. Zeljezic, M.Mladinic, V. Kasuba, S.Ramic, I.Anic, In vitro genotoxicity of root canal sealers, *Int. Endod. J.* 42 (2009) 253-263.
- [33] M. Klaude M, S. Erikson, J. Nygren, G. Ahnstrom, The comet assay: Mechanisms and technical considerations, *Mutat. Res.*, 363 (1996) 363:389.
- [34] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B.Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y.Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol.Mutagen.* 35 (2000) 205-221.
- [35] F. Barja-Fidalgo, M. Mourinho-Ribeiro, M.A.A., Oliveira, B.H. Oliveira, A Systematic Review of Root Canal Filling Materials for Deciduous Teeth: Is There an Alternative for Zinc Oxide-Eugenol?, *ISRN Dentistry* 1 (2011) 1-7s.
- [36] D.A. Ribeiro, M.E.A. Marques, D.M.F. Salvadori, Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorofenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay, *J. Endodont.* 30 (2004) 593-596.
- [37] D.A. Ribeiro, M.A. Matsumoto, M.A.H. Duarte, M.E.A Marques, D.M.F. Salvadori, In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate, *Braz. Oral Res.* 19 (2005) 183-187.
- [38] D.A. Ribeiro, M. E. A. Marques, D.M.F. Salvadori, Antimicrobial endodontic compounds do not modulate alkylation-induced genotoxicity and oxidative stress in vitro, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.* 102 (2006) e32-e36).
- [39] V. Vijayalaxmi, R.R. Tice, G.H.S.Strauss, Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique, *Mutat. Res.* 271 (1992) 243-252.
- [40] R. C. Silva, Avaliação da Genotoxicidade e Antigenotoxicidade do extrato bruto de *Garcinia angostana* L. (EBGM). (Dissertação). Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - área de concentração: Biotecnologia, Biocatálise e Genética Toxicológica. (2012). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.
- [41] A. Dhawan, M. Bajpayee, D. Parmar. Comet assay; a reliable tool for the assessment of DNA damage in diferente models, *Cell Biol. Toxicol.* 25 (2009) 5-32.
- [42] A.R. Collins, The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Mol. Biotech.* 26 (249-261) 2004.
- [43] L.P.L. Logrado, C.O. Santos, L.S. Romeiro, A.M. Costa, J.R. Ferreira, B.C. Cavalcanti, O.M. Moraes, L.V. Costa-Lotufo, C. Pessoa, M.L. Santos, Synthesis and

cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids, *Eur. J. Medic. Chem.* 45 (2010) 3480-3489.

[44] J.C. Ribeiro, L.M.G. Antunes, A.F. Aissa, J.D.C. Darina, V.V. Rosso, A.Z. Mercadante, M.L.P. Bianchi, Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay, *Mutat. Res.* 695 (2010) 22–28.

[45] J.C.G. Paiva, I.O. Cabral, B.M. Soares, C.M.L. Sombra, J.R.O. Ferreira, M.O. Moraes, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, Biomonitoring of Rural Workers Exposed to a Complex Mixture of Pesticides in the Municipalities of Tianguá and Ubajara (Ceará State, Brazil): Genotoxic and Cytogenetic Studies, *Environ. Mol. Mutagenesis* 52 (2011) 492-501.

[46] E. N. Silva-Júnior, B.C. Cavalcanti, T.T. Guimarães, M.C.F.R. Pinto, I.O. Cabral, C. Pessoa, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, C.K.Z. Andrade, M.R. Santos, C. A. Simone, M.O.F. Goulart, A.V. Pinto, Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines, *Eur. J. Medic. Chem.* 46 (2011) 399-410.

## **CONCLUSÃO GERAL**

A genotoxicidade e citotoxicidade da pasta Guedes-Pinto e do óxido de zinco reveladas neste estudo suscitam uma reavaliação de seu uso, o que implica necessariamente na realização de estudos adicionais que consubstanciem tais efeitos e os riscos reais de seu uso possam, assim, ser estabelecidos.

## REFERÊNCIAS

- AAPD - AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Reference Manual, v. 36, n.6, p. 242-250 [Adopted 1991; Revised 1998, 2001, 2004, 2009, 2014] (Available: [http://www.aapd.org/media/Policias\\_Guidelines/G\\_Pulp.pdf](http://www.aapd.org/media/Policias_Guidelines/G_Pulp.pdf)).
- ABUABARA, A.; MONGUILHOTT, C.; BARATTO-FILHO, F. Review of pulp therapy in primary teeth. *RSBO – Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v. 9, n. 4, p. 474-7, 2012.
- ALMEIDA, T.F.; CANGUSSU, M.C.T.; CHAVES, S.C.L.; SILVA, D.I.C.; SANTOS, S.C. Condições de saúde bucal de crianças na faixa etária pré-escolar, residentes em áreas de abrangência do Programa Saúde da Família em Salvador, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 9, n. 3, p. 247-52, 2009.
- ANTONIAZZI, B.F.; PIRES, C.W.; BRESOLIN, C.R.; WEISS, R.N.; PRAETZEL, J.R. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. *Brazilian Oral Research*, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.
- AZEVEDO, C.P.; BARCELLOS, R.; PRIMO, L.G. Variabilidade das técnicas de tratamento endodôntico em dentes decíduos: uma revisão de literatura. *Arquivos em Odontologia*, v.1, p. 37-43, 2009.
- ANPO, M.; SHIRAYAMA, K.; TSUTSHUI, T. Cytotoxic effect of eugenol on the expression of molecular markers related to the osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *Odontology*, v. 99, p. 188-92, 2011.
- ARAÚJO, F.B.; MASSARA, M.L.A.; PERCINOTO, C.; FARACO-JÚNIOR, I.M. Terapia Pulpar em Dentes Decíduos e Permanentes jovens. In: MASSARA, M.L.A.; REDUA, P.C.B. (Coord.). Manual de Referência Para Procedimentos Clínicos em Odontopediatria. São Paulo: Santos, 2013. 2ed
- ASSMANN, E.; BÖTTCHER, D.E.; HOPPE, C.B.H.; GRECCA, F.S.; KOPPER, P. M. P. Evaluation of Bone Tissue Response to a Sealer Containing Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, v. 41, p. 62-6, 2015.
- ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, A. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro*, v. 19, p. 1025–33, 2005.
- BARJA-FIDALGO, F.; MOURINHO-RIBEIRO, M.; OLIVEIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, B.H. A Systematic Review of Root Canal Filling Materials for Deciduous Teeth: Is

There an Alternative for Zinc Oxide-Eugenol? *ISRN Dentistry - International Scholarly Research Network*, v. 1, p. 1-7s, 2011.

BARRETO, S.S.; LUISI, S.B.; FACHIN, E.V.F. Importância da Dissociação dos Íons Cálcio e Hidroxila de Pastas de Hidróxido de Cálcio. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica*, v. 1, n.4, p. 28-37, 2005.

BIN, C.V.; VALERA, M.C., CAMARGO, S.E.A.; RABELO, S.B.; SILVA, G.O.; BALDUCCI, I.; CAMARGO, C.H.R. Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Sealers Based on Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, v. 38, p. 495–500, 2012.

BONASSI, S.; BIASOTTI, B.; KIRSCH-VOLDERS, M.; KNASMUELLER, S.; ZEIGER, E.; BURGAZ, S.; BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N.; THOMAS, P.; FENECH, M. State of art survey of the buccal micronucleus assay – a first stage in the HUMN<sub>XL</sub> project initiative. *Mutagenesis*, v. 24, n. 4, p. 295-302, 2009.

BORGES, F.F.V.; MACHDO, T.C.; CUNHA, K.S.; PEREIRA, K.C.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 3, p. 955-63, 2011.

BRAZ, M.G.; CAMARGO, M.G.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, M.E.A.; RIBEIRO, D.A *et al.* Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and portland cements. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 33, p. 234-39, 2006.

BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Sem. Cancer Biol.*, v. 15, p. 51-60, 2005.

BRZOVIC, V.; MILETIC, I.; ZELJEZIC, D.; MLADINIC, M.; KASUBA, V.; RAMIC, S.; ANIC, I. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *International Endodontic Journal*, v. 42, p. 253-63, 2009.

CAMARGO, L.B.; CAMHAJI, F.; CHELOTTI, A.; BARBOSA, J.; RAGGIO, D.P. Estudo histopatológico de lesões da furca de molares decíduos. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 9, n. 2, p. 59-64, 2009.

CAMARGO, C.H.R.; CAMARGO, S.E.A.; VALERA, M.C.; HILLER, K-A; SCHMALZ, G. and SCHWEIKL, H. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontology*. v. 108, p. 952-60, 2009.

- CAMARGO, S. E. A.; CAMARGO, C.H.R.; HILLER, K-A.; RODE, S.M; SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *International Endodontic Journal*, v. 42, p. 227–37, 2009
- CAMILLERI, J.; PITT FORD, T. R. Mineral Trioxide aggregate: aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic Journal*, v.39, p. 747–54, 2006.
- CERQUEIRA, D.F. *Efeito de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: análise de citotoxicidade e estudo in vitro da distribuição de proteínas da matrix extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa dental humana*. 2009, 82p. (Doutorado em Ciências Odontológicas / Odontopediatria, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHANG, K-C.; CHANG, C-C.; HUANG, Y-C.; CHEN, M-H; LIN, F-H; LIN, C-P. Effect of Tricalcium Aluminate on the Physicochemical Properties, Bioactivity, and Biocompatibility of Partially Stabilized Cements. *PLoS ONE*, v.9, n. 9, p.1-9, 2014.
- CHANG, Y-C.; TAI, K-W.; HUANG, F-M.; HUANG, M-F. Cytotoxic and Nongenotoxic Effects of Phenolic Compounds in Human Pulp Cell Cultures. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 8, p. 440-3, 2000.
- CHEN, C-C.; KAO, C-T.; DING, S-J.; SHIE, M-Y.;HUANG, T-H. Expression of the Inflammatory Marker Cyclooxygenase-2 in Dental Pulp Cells Cultured with Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Silicate Cements. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 465-8, 2010.
- COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair – Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p. 249-261, 2004.
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, p. 165-74, 2009.
- CORREA, G.T.B.; VERANIO, G.A.C.; SILVA, L.E.; HIRATA-JUNIOR, R.; COIL, J.M.; SCELZA, Z. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a comercial calcium hydroxide paste on THP1 Cell Line by Trypan Blue Assay. *Journal of Applied Oral Science*, v. 17, n. 5, p. 457-61, 2009.
- COSTA, L.E.D.; SOUSA, S.A.; SERPA, E.B.M.; DUARTE, R.C. Panorama do Ensino da Terapia Pulpar em Dentes Decíduos nos Cursos de Graduação em Odontologia. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 12, n. 3, p. 425-31, 2012.



- CUNHA, C.B.C.S.; BARCELLOSS, R.; PRIMO, L.G. Soluções irrigadoras e materiais obturadores utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 5, n. 1, p. 75–83, 2005.
- DE DEUS, Q. D. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 695p.
- DING, S-J.; KAO, C-T; CHEN, C-L., SHIE, M-Y.; HUANG, T-H. Evaluation of Human Osteosarcoma Cell Line Genotoxicity Effects of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Silicate Cements. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 1158–62, 2010.
- FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; BOEDECKER, R.H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, v. 566, p. 209-29, May. 2004.
- FUKS, A.B. Vital Pulp Therapy with New Materials for Primary Teeth: New Directions and Treatment Perspectives. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 7s, p.19s-24s, 2008.
- GONÇALVES, S.S. *Análise da atividade antimicrobiana de quatro pastas endodônticas sobre microorganismos removidos da cavidade pulpar de molares decíduos*. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grando Rio Prof. José de Souza Herdy, Rio de Janeiro.
- GUEDES-PINTO, A. C.; PAIVA, J. G.; BOZZOLA J. R. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. *Revista da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas*, v. 35, n. 3, p. 240-5, 1981.
- HAGIWARA, M., WATANABE, E., BARRET, J.C.; TSUTSUI, T. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutation Research*, v. 603, p. 111-20, 2006.
- HANG, B.; WANG, X.; LIU, J.; LIANG, F.; QU, X.; YANG, Z.; GAO, X. Biological Performance of Calcium Hydroxide–loaded Microcapsules. *Journal Of Endodontics*, v. 39, p. 1030–34, 2013.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCWAAD, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.R.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R.. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p. 45-51, 2003.
- HEDDLE, J. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*, v. 18, n. 20, p. 187-90, 1973.
- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of

- genotoxicity : A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research*, v. 123, n. 1, p. 61-118, Sep. 1983.
- HIKIBA, H. WATANABE, E., BARRETT, J.C.; TSUTSUI, T. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in syrian hamster embryo cells. *Journal of Pharmacology Science*, v. 97, p.146-52, 2005.
- HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008.
- HUANG, F-M.; TAI, K-W., CHOU, M-Y.; CHANG, Y-C. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide–eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*, v. 35, p. 153- 58, 2002.
- KIM, D.; KIM, E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. *In vitro* studies. *RDE - Restorative Dentistry & Endodontics*, v.39, n. 4, p. 241-52, 2014.
- KIM, R.J.Y.; SHIN, J.H. Cytotoxicity of a novel mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *Dental Materials Journal* , v. a33, n. 3, p. 313–18, 2014.
- KHEDMAT, S.; DEHGHAN, S.; HADJATI, J.; PLATT, J.A. *In vitro* cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *RDE – Restorative Dentistry & Endodontics*, v. 39, n. 3, p. 149-54, 2014.
- LABBAN, N.; YASSEN, G.H.; WINDSOR, J.; PLATT, J.A. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dental Traumatology*, v, 30, p. 429–34, 2014.
- LACATIVA, A.M.; LOYOLA, A.M.; SOUSA C.J.A. Histological Evaluation of Bone Response to Pediatric Endodontic Pastes: An Experimental Study in Guinea Pig. *Brazilian Dental Journal*, v. 23, n. 6, p. 635-4, 2012.
- LEE, B-N.; SON, H-J.; NOH, H-J.; KOH, J-T.; CHANG, H-S.; HWANG, I-N.; HWANG, Y-C.; OH, W-M. Cytotoxicity of Newly Developed Ortho MTA Root-end Filling Materials. *Journal of Endodontics*, v. 38, p. 1627–30, 2012.
- LEITE, A.C.G.L; ROSENBLATT, A.; CALIXTO, M.S.; SILVA, C.M.; SANTOS. N. Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. *Mutation Research* , v. 747, p. 93 – 7, 2012.

- LEONARDO, M.R. *Endodontia - Tratamento de Canais Radiculares*. São Paulo: Artes Médicas. 2005, 1550p.
- LOSSO, E.M.; TAVARES, M.C.R.; SILVA, J.Y.B; URBAN, C.A. Severe early childhood caries: an integral approach. *Jornal de Pediatria*, v.85, n. 4, p. 295-300, 2009.
- LOU, J.; HE, J.; SHENG, W.; JIN, L.; CHEN, Z.; CHEN, S.; LIN, Y.; XU, S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mut Res*. 617: 104-110, 2007.
- LOURENÇO-NETO, N.; FERNANDES, A.P.; MARQUES, N.C.T.; SAKAI, V.T.; MORETTI, A. B.S.; MACHADO, M.A.A.M.; ABDO, R.C.C.; OLIVEIRA, T.M. Terapia pulpar em dentes decíduos: possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 42, n.2, p. 130-7, 2013.
- MACGREGOR, J.T., HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103-112, 1987.
- MARCU, L.G.; YEOH, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 135, p. 1303-14, 2009.
- MARZIN, D. The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutation Research*, v.1-2, p. 175-81, 1997.
- MASSARA, M.L.A.; TAVARES, W.L.F.; NORONHA, J.C.; HENRIQUES, L.C.F.; RIBEIRO-SOBRINHO, A.P. A eficácia do Hidróxido de Cálcio no Tratamento Endodôntico de Decíduos: Seis Anos de Avaliação. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 12, n. 2, p. 155-9, 2012.
- MATTER, B.; SCHMID, W. Treminon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research*, v. 12, p. 417-25, 1971.
- MEIRELES, J.R.C.; OLIVEIRA, S.V.; COSTA-NETO, A.O.; CERQUEIRA, E.M.M. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). *Mutation Research*, v.753, p. 72-5, 2013.

- MELLO-MOURA, A.C.V.; CERQUEIRA, D.F.; SANTOS, E.M. Pasta Guedes-Pinto. Revisão de literatura: 26 anos de estudo sobre citotoxicidade, citotóxicos, histopatológicos, microbiológicos e clínicos/ Guedes-Pinto Paste. *RPG – Revista da Pós-Graduação da FOU SP*, v. 14, n.3, p. 260-6, 2007.
- MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P.M.H. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*, v. 44, 697–730, 2011.
- MOTA, C.C.B.O.; BRASIL, C.M.V.; CARVALHO, N.R.; BEATRICE, L.C.S.; TEIXEIRA, H.M.; NASCIMENTO, A.B.L.; VICENTE-SILVA, C.H. Propriedades e aspectos biológicos do agregado trióxido mineral: revisão da literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.39, n. 1, p. 49-54, 2010.
- NAGEM-FILHO, H.; NAGEM, H.D.; COUTINHO, K.Q.; CARVALHO, P.R.M.A.; FIUZA, C.T. Propriedades do Paramonoclorofenol Canforado e Paramonoclorofenol Canforado Associado ao Hidróxido de Cálcio. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 7, n.3, p. 235-9, 2007
- NAGHAVI, N.; GHODDUSI, J.; SADEGHNIA, H.R.; ASADPOUR, E.; ASGARY, S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dental Materials Journal*, v. 33, n. 1, p. 64–9, 2014.
- NEVILLE, B.W. *Patologia oral & maxilofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004. xviii, 798 p, il. Tradução de: Oral & maxillofacial pathology.
- NOWICKA, A.; LIPSKI, M.L.; PARAFINUK, M.; SPORNIK-TUTAK, K.; LICHOTA, D.; KOSIERKIEWICZA, A.; KACZAMAREK, W.; BUCAKOWSKA-RADLINSKA, K. Response of Human Dental Pulp Capped with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *Journal Endodontics*, v. 39, p. 743–7, 2013.
- OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Research*, v. 117, p. 79-92, 1989.
- OLIVE, P.G.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, v.1, n. 1, p. 23-29, 2006.
- OSTLING, O.; JOHANSON, Johanson, Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical Biophysical Research Community*, v. 123, p. 291–298, 1984.
- PAIVA, J.C.G.; CABRAL, I.O.; SOARES, B.M.; SOMBRA, C.M.L.; FERREIRA, J.R.O., MORAES, B.C.C.; PESSOA, C. Biomonitoring of Rural Workers Exposed to a

- Complex Mixture of Pesticides in the Municipalities of Tiaguá and Ubajara (Ceará State, Brazil): Genotoxic and Cytogenetic Studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, p. 492-501, 2011.
- PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 400–13, 2010.
- PETEL, R.; MOSKOVITZ, M.; TICKOTSKY, N.; HALABI, A.; GOLDSTEIN, J.; HOURI-HADDAD, Y. Cytotoxicity and proliferative effects of Iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Archives of Oral Biology*, v. 58, p. 75-81, 2013.
- PINHEIRO, H.H.C.; ASSUNÇÃO, L.R.S.; TORRES, D.K.B.; MIYAHARA, L.A.N.; ARANTES, D.C. Terapia Endodôntica em Dentes Decíduos por Odontopediatras. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*. João Pessoa, v. 13, n. 4, p. 351-60, 2013.
- PINTO, D.N.; SOUSA, D.L.; ARAÚJO, R.B.R.; MOREIRA-NETO, J.J.S. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. *Dental Traumatology*, v. 27, p. 221-4, 2011.
- PIVA, F.; FARACO-JUNIOR, I.M.; FELDENS, C.A.; ESTRELA, C.R. A. Ação Antimicrobiana de Materiais Empregados na Obturação dos Canais de Dentes Decíduos por Meio da Difusão em Ágar: Estudo in vitro. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 9, n. 1, p. 13-7, 2009.
- POGGIO, C., ARCIOLA, C.R., BELTRAMI, R.; MONACO, A.; DAGNA, A.; LOMBARDINI, M.; VISAI, L. Cytocompatibility and Antibacterial Properties of Capping Materials. *The Scientific World Journal*, 2014. Article ID 181945, 10 pages. (Available: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/181945>)
- PRIMOSCH, E. Primary tooth pulp therapy as taught in predoctoral pediatric dental programs in the United States. *Pediatric Dentistry*, v. 19, n. 2, p. 118–22, 1997.
- QUEIROZ, A.M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B.; SILVA, R.A.B.; ITO, I.Y. Antibacterial Activity of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth: Zinc Oxide and Eugenol Cement, Calen Paste Thickened with Zinc Oxide, Sealapex and EndoREZ. *Brazilian Dental Journal*, v. 20, n. 4, p. 290-6, 2009.
- QUEIROZ, A.M.; ASSED, S.; CONSOLARO, A.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; SILVA, R.A.B.; SILVA, L.A.B. Subcutaneous Connective Tissue Response to

Primary Root Canal Filling Materials. *Brazilian Dental Journal*, v. 22, n. 3, p. 203-11, 2011.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – Métodos e critérios de avaliação. Sociedade Brasileira de Genética, pp.83-85, 1991.

RABELLO-GAY, M.N. Teste do micronúcleo em medula óssea. *Mutagênese, Interatogênese e Carcinogênese – Métodos e critérios de Avaliação*. São Paulo: FCA, p. 83-90, 1991.

RAMAR, K.; MUNGARA, J. Clinical and radiographic evaluation of pulpectomies using three root canal filling materials: An *in-vivo* study. *Journal Indian Society of Pedodontics and Prevention Dentistry*, v. 28, n. 1, p. 25-9, 2010.

RAMOS, M.E.S.P.; CAVALCANTI, B.C.; LOTUFO, L.V.C.; CERQUEIRA, E.M.M.; PESSOA, C. Evaluation of mutagenic effects of formocresol: detection of DNA-protein cross-links and micronucleus in mouse bone marrow. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontic*, v. 105, p. 398-404, 2008.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 475p, il. Tradução de: Oral pathology : clinical pathologic correlations.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, 2003. 355p.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Org.). Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, 2003. 355p

RIBEIRO, D.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorofenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *Journal of Endodontics*, v. 30, n. 8, p. 593-6, Aug., 2004.

RIBEIRO, D.A.; MATSUMOTO, M.A.; DUARTE, M.A.H.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Brazilian Oral Research*, v. 19, n.3, p. 183-7, 2005a.

RIBEIRO, D.A.; SCOLASTICI, C.; LIMA, P.L.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontics*, v. 99, p. 637-40, 2005b.

- RIBEIRO, D.A.; SUGUI, M.M.; MATSUMOTO, M.A.; DUARTE, M.A.H.; MARQUES, M.E.A. and SALVADORI, D.M.F. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontics*, v. 101, p. 258-261, 2006a.
- RIBEIRO, D.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Antimicrobial endodontic compounds do not modulate alkylation-induced genotoxicity and oxidative stress in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics*, v. 102, p. 32-6, 2006b.
- ROBERTS, H.W.; TOTHB, J.M.; BERZINS, D.W.; CARLTON, D.G. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dental Materials*, v. 24, p. 149-64, 2008.
- ROSSI, A.; SILVA, L.A.B.; HERNANDEZ, P.G.H.; SOUSA-NETO, M.D.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, R.A.B.; QUEIROZ, A.M. Comparison of Pulpal Responses to Pulpotomy and Pulp Capping with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate in Dogs. *Journal of Endodontics*, v. 40, p.1362–69, 2014.
- SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SHEYKHREZAI, M.S.; ALIGHOLI, M.; GHORBANZADEH, R.; BAHADOR, A. A Comparative Study of Antimicrobial Activity of Proroot MTA, Root MTA, and Portland Cement on *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Internation Endodontic Journal*, v. 3, n.4, p. 129-33, 2008.
- SILVA, M.A.G.S.; MENDONÇA, E.F.; RODRIGUES, K.F.M.; BARIANI, C.; SILVA, G.B.L. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Formocresol e do Paramonoclorofenol Canforado. *Revista de Odontologia do Brasil Central*, v. 15, n. 40, p.1-8, 2006.
- SILVA, G.N.; BRAZ, M.G.; CAMARGO, E.A.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, D.A. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and White mineral trioxide aggregate. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontic*, v. 102, p. 50-4, 2006.
- SILVA, L.A.B.; LEONARDO, M.R.; OLIVEIRA, D.S.B.; SILVA, R.A.B.; QUEIROZ, A. M.; HERNANDEZ, P.G.; NELSON-FILHO, P. Histopathological Evaluation of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth. *Brazilian Dental Journal*, v. 21, n. 1, p. 38-45, 2010.

- SILVA, E.J.N.L.; HERRERA, D.R.; ROSA, T.P.; DUQUE, T.M; JACINTO, R.C.; GOMES, B.P.F.; ZAIA, A.A. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material *Journal of Applied Oral Science*, v. 22, n. 1, p. 61-7, 2014.
- SINGH, M.P; MCCOY, M.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-91, 1988.
- SIQUEIRA-JR, J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review (Review). *International Endodontic Journal*, v. 32, p. 361-9, 1999.
- SRINIVASAN, V.; WATERHOUSE, P.; WHITWORTH, J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 19, p. 34-47, 2009.
- STANCKIEWICKZ, A.; COLOMBELLI, C.M.; GONÇALVES, T.S.; FORTES, C.B.B.; MUNERATO, M.C.; SAMUEL, S.M.W. Avaliação das Propriedades do Cimento de Óxido de Zinco e Isoeugenol. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, v. 42, n. 2, p. 14-20, 2000.
- TANNURE, P.N.; AZEVEDO, C.P.; GLEISER, R.; PRIMO, L.G. Long-term Outcomes of Primary Tooth Pulpectomy With and Without Smear Layer Removal: A Randomized Split-mouth Clinical Trial. *Pediatric Dentistry*, v. 33, p. 316-20, 2011.
- TANNURE, P.N.; FIDALGO, T.K.S.; BARCELOS, R.; PRIMO, L.G.; BARROS, L.C. Analysis of Root Canal Treated Primary Incisor After Trauma: Two Year Outcomes. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, v. 36, n. 3, p. 257–62, 2012.
- TESSARE, P.O.; BERNARDES-FONSECA, M.; MACHADO, M.L.B.L.; FAVA, A.S. Propriedades, características e aplicações clínicas do Agregado Trióxido Mineral – MTA. Uma nova perspectiva na Endodontia. Revisão de Literatura. *E.J.E.R. Electronic Journal of Endodontics Rosario*, v. 1, n. 4, p. 1-15, 2005.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BRULINSON, B., HARMTAMNN A.; KOBAYAHSI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKY, Y.F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 205-221, 2000.
- TOLEDO, R.; BRITTO, M.L.B.; PALOTTA, R.C.; NABESHIMA, C.K. Hidróxido de Cálcio e Iodoformio no tratamento endodôntico de dentes com Rizogênese Incompleta. *International Journal of Dentistry*, v. 9, n. 1, p. 28-37, 2010.



- TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 190-202, 2010.
- TRAIRATVORAKUL, C.; CHUNLASIKAIWAN, S. Success of Pulpectomy With Zinc Oxide-Eugenol Vs Calcium Hydroxide/Iodoform Paste in Primary Molars: A Clinical Study. *Pediatric Dentistry*, v. 30, n. 4, p. 303-8, 2008.
- VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis*, v. 25, n. 2, p. 287-99, 2010.
- VILAR, J.B.; FERREIRA, F.L.; FERRI, P.H.; GUILLO, L.A.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal Of Biologoy*, v. 68, p. 41-7, 2008.
- von-LEDEBUR, M. ; SCHMID. W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research.*, v. 19, p. 109-117, 1973.
- WONG, V.W.C.; SZETO, Y.T.; COLLINS, A.R.; BENZIE, I.F.F. The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research*, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2005. The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research*, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2005.
- YILDIZ, E.; TOSUN, G. Evaluation of formocresol, calcium hydroxide, ferric sulfate, and MTA primary molar pulpotomies. *European Journal Dentistry*, v. 8, p. 234-40, 2014.
- ZARZAR, P.A., ROSENBLATT, A., TAKAHASHI, C.S; TAKEUCHIB, P.L.; COSTA-JUNIOR, L.A. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. *Journal of Dentistry*, v. 31, p. 479-85, 2003.
- ZEFERINO, E.G.; BUENO, C.E.S.; OYAMA, L.M.; RIBEIRO, D.A. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *International Endodontic Journal*, v. 43, p. 843–8, 2010.
- ZEIGER, E. Identification of Rodent Carcinogens and Noncarcinogens Using Genetic Toxicity Tests: Premises, Promises, and Performance. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 28, n.2, p. 85-95, 1998.

**Anexo I – Instrução aos autores (Periódico Mutagenesis)**

We use cookies to enhance your experience on our website. By clicking 'continue' or by continuing to use our website, you are agreeing to our use of cookies. You can change your cookie settings at any time.  
[Read our cookies](#)

Oxford Journals | Medicine & Health & Science & Mathematics | Mutagenesis | For Authors | Instructions To Authors

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Manuscripts must be submitted online. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below please visit the [author submission website](#). Instructions on submitting your manuscript online can be [found here](#).

### SCOPE AND POLICY OF MUTAGENESIS

*Mutagenesis* is an international multi-disciplinary journal designed to bring together research aimed at the identification, characterization and distribution of the mechanisms of action of physical, chemical and biological agents capable of producing genetic change in living organisms and the study of the consequences of such changes.

A variety of different types of manuscript are published in *Mutagenesis*:

**Original articles**, reporting the results of fundamental and molecular studies upon the mechanisms of induction of point, chromosomal and genetic mutations and their roles in inherited and somatic disorders.

**Papers on published/for-acceptance testing of environmental agents**, which describe and discuss the techniques and quality control standards necessary for adequate testing of environmental agents.

**Cell lines, strains, DNA probes etc.** The submission to and acceptance of a manuscript for publication in *Mutagenesis* implies that the authors will provide samples of such materials as cell lines, strains, mutants and DNA probes described in their publication to other investigators for research purposes.

**Animal husbandry.** Papers that report experiments involving live animals must include a statement that the animals were treated and housed in accordance with approved guidelines (giving the source) or supervised by an animal care committee (giving the name) or both.

**Letters to the Editor** may be submitted on current topics. Both interviewee names described, social and personal aspects of mutagenesis changes, but should aim for a concise presentation.

**Reviews** The Editors welcome the submission of reviews of topics covering all aspects of mutagenesis changes.

**Mini-reviews** *Mutagenesis* publishes well-written systematic reviews on gene variants that conform to standards such as the *Mini-analysis of Observational Studies in Epidemiology* standards (Steyer, DE, Berlin, JA, Moore, DC, et al. *Mini-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting: Mini-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. *JAMA*. 2003;289(2):2530-2542).

However, due to a change in policy, single gene SNP or single disease systematic reviews or meta-analyses will no longer be published, except in exceptional circumstances. The Editorial Board retains reviews of exceptional quality on very relevant topics only. For all other cases, we suggest consulting the [StatEdit website](#) <http://www.oxjournals.org/submitting/policies/index.htm>

All manuscripts submitted to *Mutagenesis* are referred for their pertinence, content and relevance to the scope of the journal.

### SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

*Mutagenesis* accepts submissions online at <http://mc.manuscriptcentral.com/hmg>

**Author Self-Archiving/Publish Access policy from May 2009**  
 For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#) <http://www.oxfordjournals.org/submitting/policies/index.htm>.

For instructions on how to submit your manuscript online please [click here](#).

For any queries please contact the editorial office:  
 Prof. D.H Phillips, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 99L, UK.  
[Click here](#) to email the Editorial Office.

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be enclosed with the paper.

### OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

*Mutagenesis* authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open publishing](#) scheme, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a secondary license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard advertising-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons license.

BOCUP/Elsevier Trust funded authors publishing in *Mutagenesis* can use the Creative Commons Attribution license (CC-BY) for their articles.

All other authors can use the following Creative Commons license  
 - Creative Commons Attribution Non-Commercial license (CC-BY-NC)

Please [click here](#) for more information about the Creative Commons license.

If you choose the Open Access option you can pay the charges using our [Author Service site](#). This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post.

The applicable open access charges vary according to which Creative Commons license you select. The open access charges are as follows.

Charges for CC-BY)

About this Journal

Rights & Permissions

Dispatch Date of the next issue

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE)

We are available - find out more

Journal Career Network

Published on behalf of

The UK Environmental Mutagen Society

**oxfords**

OXFORD JOURNALS ONLINE

Impact factor: 3.487

5-Yr Impact factor: 5.716

Editor-in-Chief

Professor David Phillips

[View full editorial board](#)

Instructions to authors

Online submission

Submit Now!

OXFORD  OPEN

Open access options for authors - visit [Oxford Open](#)

[Self-archiving policy](#)



This journal enables compliance with the [UK Public Access Policy](#)

The journal is fully compliant with the [UK and Wellcome Trust Open Access policies](#)  
 For more information [click here](#)

Send table of contents

Send Abstract Access

Go Back

XML RSS feed

Advertising rates

Sign up

Supplements

26/05/2015

Oxford Journals | Medicine &amp; Health Science &amp; Mathematics | Mutagenesis | Instructions To Authors

- Regular charge £2000/\$1000/4000
- List B Developing country charge\* £1000/\$1000/4000
- List A Developing country charge\*\* £0/0/0

WJ0207

**Charges for IC:HY:MC**

- Regular charge £1750/\$2000/42275
- List B Developing country charge\* £875/\$1000/40137.50
- List A Developing country charge\*\* £0/0/0

On a weight

\*Visit our developing countries page (click [here](#) for a list of qualifying countries).

Please note that these charges are in addition to any colour charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT account.

**CONFLICT OF INTEREST DECLARATION**

At the point of submission, Mutagenesis policy requires that each author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or recommendations – including professional, commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. When considering whether you should declare a conflicting interest or connection please consider the conflict of interest link. Do have any arrangement that would influence you or any of your co-authors if it was to emerge after publication and you had not declared it?

As an integral part of the online submission process, Corresponding authors are required to confirm whether they or their co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will then be required to submit a completed [Conflict of Interest form](#) to the Production Office. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy.

If the manuscript is published, Conflict of Interest information will be communicated in a statement in the published paper.

**PROOFS**

Authors are sent page proofs electronically as a PDF file, or by post if required. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors and returned to the publishers by express (airmail delivery) post. Alternatively, to save time, corrections may be given to Oxford University Press by fax: +44 (0)1865 353373. Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a trace added to proof. A change is made to authors who have not responded within the limit of the page proof stage.

**LICENCE TO PUBLISH**

It is a condition of publication in the Journal that authors grant an exclusive licence to UK Environmental Mutagen Society. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be as widely disseminated as possible. Authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, and Oxford University Press is notified in writing and in advance.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press (OUP) may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

**PREPARATION OF MANUSCRIPTS**

Manuscripts should be in final form when they are submitted so that proofs require only correction of typographical errors.

**Sections of the manuscript**

Regular full-length papers should be subdivided into the following sequence of sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to figures, Tables. The Title page must include the telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. In the Journal, the Materials and methods, Acknowledgements and References sections are printed in smaller type to accommodate more text. The Materials and methods section must give precise details of strains, concentrations and methods. Where an activation system has been included it is necessary to know (i) the source, (ii) the culture and (iii) the concentration treatment time, and conditions must be specified. Positive and negative controls together with their concentrations must be included. The number of replicates and the number of repeat experiments should be stated. Additional factors for in vivo tests should include age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. A detailed dose regime is required. Figures for the histogenetically testing section should conform to the above requirements. In addition, results should be presented in concise form.

**General format**

Prepare your manuscript text using a Word processing package (write in plain or off format). Use double spacing (space between lines of type and line from 6 mm) throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Number each page. Please avoid footnotes, use instead, and as sparingly as possible, parentheses within brackets. Note text in the style and order of the journal. Type references in the correct order and style of the journal. Type equated, without hyphenation, except for compound words. Type headings in the style of the journal. Use the TAB key once for paragraph indents. Where possible use Times for the text font and Symbol for the Greek and special characters. Use the word processing formatting features to indicate Bold, Italic, Underline, Underline, Superscript and Subscript characters. Clearly identify unusual symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1. Mark the approximate position of each figure and table.

Check the final copy of your paper carefully, as any spelling mistakes and errors may be translated into the typeset version.

**Abstract**

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should be a single paragraph not exceeding 300 words. Please state clearly by the limitation of length. Published papers will only have the first 300 words of their abstracts incorporated into Medline, and in some cases this limit will be less. The Abstract should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided.

**Funding**

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the Acknowledgements section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin "This work was supported by ..."
- The full official funding agency name should begin so, i.e. "The National Cancer Institute at the National Institutes of Health" or simply "National Institutes of Health" and "MRC" (one of the 27 subdivisions) or "MRC at NIN" (full RCU approval list of UK funding agencies). Grant numbers should be given in brackets as follows: "[grant number xxxx]".
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: "[grant numbers xxxx, yyyy]".
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus "and" before the last funding agency).
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number: "to [author initials]".

An example is given here: "This work was supported by the National Institutes of Health [AA12345 to C.S., RR56789 to M.H.] and the Medical Research Council [J0123456789]."

Oxford Journals will deposit all NIN funded articles in Published Oxford, the Depositing articles in repositories - information for authors

[http://www.oxfordjournals.org/our\\_journals/mutagen/for\\_authors/general.html](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mutagen/for_authors/general.html)

24

for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NOT funded using the guidelines above.

#### Acknowledgements

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgements should provide those of institutions or agencies.

#### References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal) which has accepted them) may be included. In the text, references should be cited, in order of appearance, as a number in brackets, e.g. (1). These should be on the list, do not use superscript. At the end of the manuscript the citations should be listed numerically. References should include, in the following order: all authors' names (with surnames and initials inverted), year, page title in full, journal title, volume number and inclusive page numbers. If a book, the name and address of the publisher should be given. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and underlined to indicate italics.

References should therefore be listed as follows:

1. Bentley-Arg, R. and Nydaly-Nelson, F. (1981) Comparative genetic toxicity of nitrobenzotriazole and two nitrobenzotriazole derivatives. *Mutagenesis*, **6**, 1837-1840.
2. Kirk, J.T.G. and Wiley-Rosell, R.A.K. (1982) *The Plastics: Their Chemistry, Structure, Properties and Performance*, 2nd edn and edn. Hanser Technik Verlag, New York.
3. Warren, W. (1980) The analysis of alkylated DNA by high pressure liquid chromatography. In: *Genetic and Toxicology*, 1st edn, *Mutagenicity Testing - a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 23-34.

Personal communication (1 text), personal communication should be indicated by those involved, in writing, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Nelson and Wilson, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

#### Tables

Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to tables submitted by letter, one below each acceptable, but they should not include extensive experimental detail. An arrow in the text margin should be used to indicate where a table should be inserted in the text.

#### Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred to in the text as Figure 1 etc., which should be abbreviated to 'Fig. 1' only in the figure legend. Figures must be prepared at publication quality resolution, using applications capable of generating high-resolution TIFF files of at least 300 pixels per inch at the final printed size for colour figures and photographs, and 1200 pixels per inch for black and white line drawings. Although some other formats can be translated into TIFF format by the publisher, the conversion may alter the lines, resolution and content of the image. Digital colour art should be submitted as CMYK, rather than RGB format, as the printing process requires colours to be expanded into CMYK and this conversion can alter the intensity and brightness of colours. Therefore authors should be satisfied with the colours in CMYK (only on screen and when printed) before submission. Please also keep in mind that colours can appear differently on different screens and printers. Failure to follow these guidelines could result in complications and delays.

**Photographs** These must be submitted in the desired final size so that reduction can be avoided. The type area of a page is 216 x 303 mm (width) and photographs, including their legends, must not exceed this area. A single column is 88 mm wide. A double column is 187 mm wide. Ideally, photographs should fit either a single column or a double column. Photographs should be of sufficiently high quality with regard to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a scale on the photographs.

**Colour figures** There is a special charge for the inclusion of colour figures. The cost is £300 per figure. Colours from UK will be subject to the current UK VAT charge. For colours from the rest of the EU, we will assume that the service is provided for business purposes, please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

**Line drawings** Please provide lines as clear, sharp prints, suitable for reproduction as submitted. No additional artwork, redrawing or retyping is done. Therefore, all labelling should be on the original drawing. Ensure that the size of labelling is in proportion with the overall dimensions of the drawing. Ideally, line drawings should be submitted in the desired final size to avoid reduction (maximum dimensions 216 x 303 mm including legends) and should fit either a single (88 mm) or a double column width (187 mm). If submitting line drawings which require reduction, please check that the labelling will be clearly legible after the drawing has been reduced to the extent which it will be printed. After reduction, letters should not be smaller than 1.5 mm in height.

**Figure legends** These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text should not be redefined in the legend.

#### Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn).

Follow *Chemical Abstracts* and its indices for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended names assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized, phenotypes should not be italicized. For bacterial genetic nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

#### Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to 20 symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurement and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

#### LANGUAGE EDITING PRE-SUBMISSION

OLP offers pre-submission language editing through Oxford Language Editing, a service for researchers all over the world. Language editing, particularly if English is not your first language, can be used to ensure that the scientific content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers. Visit [www.oxfordlanguageediting.com](http://www.oxfordlanguageediting.com) to find out more about the freelance editors available and the different services offered. Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer review by the journal.

#### OFFPRINTS

The publishers supply the URL upon electronic publication. Offprints can be purchased using the Oxford Journals Author Services site.

#### AUTHOR SELF-ARCHIVING/PUBLIC ACCESS POLICY

For information about the journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#).

**Anexo II – Ofício de aprovação CEUA/UEFS**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Feira de Santana, 10 de outubro de 2011.

Ofício: 008/11

DE: Prof. Dr. Eraldo Medeiros Costa Neto  
Coordenador em Exercício do CEUA/UEFS

PARA: Nilton César Nogueira dos Santos  
Departamento de Saúde da UEFS  
Doutorando em Biotecnologia

Prezado Pesquisador,

O projeto "Análise comparativa da genotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste cometa em linfócitos e de micronúcleo em medula óssea de camundongos" foi analisado, obtendo parecer favorável à execução do mesmo.

O parecer foi apresentado na reunião do dia 10 de 2011, na sala do Comitê de Ética no Uso de Animais, colocado em votação sem que houvesse objeções por parte dos membros do Comitê, o mesmo foi aprovado por unanimidade.

Desejamos sucesso.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Eraldo Medeiros Costa Neto

Coordenador em Exercício do CEUA/UEFS

**Anexo III – Instrução aos autores (Períodico Mutation Research)**





## MUTATION RESEARCH - GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS

A section of Mutation Research

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1383-5718

#### DESCRIPTION

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services .

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

#### AUDIENCE

Environmental Scientists, Occupational Health Researchers, Mutageneticists, Toxicologists

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

#### Types of Paper

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The Journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

Any submissions that report the results of studies on extracts or complex mixtures (e.g., solvent extracts of herbal preparations; soil, air, or water samples) will receive preliminary review by an Editor. Unless such manuscripts offer significant new insight, such as the chemical identification of previously unknown mutagens or anti-mutagens, they will be returned to the authors without being sent for further review. For further clarification of this journal policy please refer to the [Editorial](#) published in *Mutation Research* 391 (1997) 1.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports the results of molecular epidemiology studies.

(i) As with any studies involving human subjects, approval by an appropriately constituted ethics review board and informed consent by participants are required.

(ii) Authors are advised to collaborate with qualified epidemiologists with respect to study design and interpretation.

(iii) In studies of the potential genotoxic effects of exposure to environmental agents, it is strongly recommended that quantitative evidence of exposure (such as analysis of personal monitoring devices or measurement of urinary biomarkers, for example) be obtained.

Manuscripts which do not conform to these requirements will be returned to the authors without being sent for further review.

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. Please declare any financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented. Interests could include employment, consultancies, stock ownership and honoraria. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest". If there are any financial or personal interests please state so here and include this statement as an Acknowledgement in your submitting manuscript. Signed copies of the *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript.

### *Submission declaration*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

A Chinese version of the submission instructions for MUTGEN can be found [here](#).

### *Changes to authorship*

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### *Copyright*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are

included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

##### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

##### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific

English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Referees**

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

### **Free access to scientific publications for public institutions in developing countries:**

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: <http://www.who.int/hinari/en/>

## **PREPARATION**

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### **Results**

Results should be clear and concise.

#### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.