

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIODENTINE™

GUSTAVO DE ALMEIDA LOGAR

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIODENTINE™

GUSTAVO DE ALMEIDA LOGAR

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.089 76
L831a

Logar, Gustavo de Almeida.
Avaliação da genotoxicidade e
mutagenicidade do biodentine / Gustavo de
Almeida Logar. – Presidente Prudente, 2014.
44 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1.Cimento de silicato. 2. Genotoxicidade. 3.
Mutagenicidade. 4. Testes para Micronúcleos. 5.
Endodontia. I. Título..

GUSTAVO DE ALMEIDA LOGAR

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO
BIODENTINE™**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 23 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos
Faculdade de Odontologia de Bauru - FOUSP
Bauru-SP

Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Graziela Ávila Galhano Logar pelo apoio dado durante o mestrado e pelo grande presente de nossa vida, nosso filho João Victor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora de mestrado Gisele Alborghetti Nai pelo exemplo de profissional a ser seguido, pela paciência e por ter feito com que esse mestrado tenha sido prazeroso desde seu início.

Agradeço aos meus professores do mestrado em ciência animal, Vamilton, Cecília, Rosa, Inês, Rogério, Paulo, Silvia, Renata por terem contribuído para o enriquecimento do meu conhecimento na área de saúde em especial a de medicina veterinária.

Agradeço aos colegas de mestrado, Leandro, Larissa, Cláudia, Juliana e Adriana, por terem dividido suas experiências como profissionais de diversas áreas da saúde.

Agradeço ao Professor Marcelo Ladeira do laboratório Multigene pela ajuda nas dúvidas que eu tive sobre genotoxicidade, pelo exemplo de competência, conhecimento e exigência na execução do teste do cometa.

Agradeço ao Professor Marcelo Chacur e pelo residente Gabriel pelo empréstimo de nitrogênio líquido.

Agradeço ao laboratório Berrante pelo empréstimo do container de nitrogênio líquido para armazenamento das amostras.

Agradeço a professora da odontologia Graziela Mori por ter ajudado com parte da metodologia do trabalho e nas dúvidas sobre o produto testado.

Agradeço a professora Lígia Moraes por ter conseguido o Biodentine™ para o estudo e por ter ajudado na execução do experimento.

Agradeço ao professor José Luiz Parizi pela ajuda na cirurgia e coleta do material para o experimento.

Agradeço aos alunos da odontologia Felipe Cabral, Ana Elisa Maranhão e a aluna de medicina Bruna Ferreira, por terem participado do projeto e terem auxiliado na execução do experimento.

Agradeço aos funcionários do Biotério central e da farmácia do Hospital veterinário pela ajuda com as cobaias e medicamentos.

Aos animais que participaram do experimento e que foram responsáveis por mais uma nova descoberta que ajudará a nós, seres humanos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIODENTINE™

O Biodentine™ é um novo material indicado para diversas situações clínicas na odontologia. Apesar de ser um material promissor, ainda há poucos trabalhos avaliando as características deste material, em especial sua genotoxicidade e mutagenicidade. **Objetivo:** Este estudo visa avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do Biodentine™ “in vivo”. **Material e métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar albinos, machos, distribuídos em 3 grupos: A – 8 ratos onde foram colocados corpos de prova medindo 2mm de diâmetro x 10mm de comprimento com Biodentine™ no subcutâneo do dorso; B – 8 ratos, que receberam ciclofosfamida em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (grupo controle positivo); C – 8 ratos onde foram colocados corpos de prova medindo 2mm de diâmetro x 10mm de comprimento sem Biodentine™ no subcutâneo do dorso (grupo controle negativo). Após 24 horas, todos os animais foram eutanasiados e material da medula óssea dos fêmures foi coletado para realização do Teste do Cometa e do Teste do micronúcleo. **Resultados:** O Biodentine™ apresentou níveis de danos no DNA (*tail intensity* %) em células da medula óssea de $23,57 \pm 7,70$, a ciclofosfamida de $27,43 \pm 7,40$ e o controle negativo de $24,75 \pm 5,55$ ($p < 0,05$). A média de micronúcleos no grupo exposto ao Biodentine foi de 6,25 (desvio padrão – DP= 3,53), no grupo exposto a ciclofosfamida foi de 9,75 (DP= 2,49) e no grupo de controle negativo foi 0,75 (DP= 1,03) ($p < 0,0001$). **Conclusão:** O Biodentine™ apresentou aumento na frequência de micronúcleos, mas não apresentou efeito genotóxico observado pelo teste do Cometa.

Palavras-chave: cimento de silicato, genotoxicidade, mutagenicidade, testes para micronúcleos, endodontia.

ABSTRACT

EVALUATION OF GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY OF BIODENTINE™

The Biodentine™ is a new material suitable for various clinical situations in dentistry. Despite being a promising material, there are few studies evaluating the characteristics of this material, especially its genotoxicity and mutagenicity. **Objective:** This study aims to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of Biodentine™ "in vivo". **Methods:** We used 24 Wistar albino rats, males were divided into 3 groups: A - 8 rats where specimens of Biodentine™ measuring 2 mm in diameter x 10mm length on the dorsum were placed, B - 8 rats, which received cyclophosphamide in single subcutaneous dose (50mg/kg) on the first day of the experiment (positive control group), C - 8 rats where specimens measuring 2 mm in diameter x 10mm long without Biodentine™ on the dorsum were placed (negative control group). After 24 hours, all animals were euthanized and material from bone marrow of femurs was collected to perform the Comet assay and micronucleus test. **Results:** Biodentine™ showed levels of DNA damage (tail intensity %) in bone marrow cells of 23.57 ± 7.70 , cyclophosphamide of 27.43 ± 7.40 and negative control of 24.75 ± 5.55 ($p < 0.05$). The average number of micronuclei in the exposed Biodentine™ group was 6.25 (standard deviation - SD = 3.53), in the group exposed to cyclophosphamide was 9.75 (SD = 2.49) and negative control group was 0.75 (SD = 1.03) ($p < 0.0001$). **Conclusion:** The Biodentine™ showed an increase in the frequency of micronuclei, but no genotoxicity effect by the Comet assay.

Key words: silicate cement, genotoxicity, mutagenicity, micronucleus tests, endodontics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Biodentine™.....	10
1.2 A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana.....	11
1.3 Exposição Humana a Agentes Mutagênicos.....	12
1.4 Teste para Avaliação de Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	12
1.5 Teste do Micronúcleo.....	14
1.6 Teste do Cometa.....	15
REFERÊNCIAS.....	17
2 ARTIGO.....	19
ANEXOS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da Odontologia é manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente. Este objetivo pode ser alcançado pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, aperfeiçoamento da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética e pela melhora da aparência. Em virtude de muitos desses objetivos requererem a reposição ou alteração da estrutura dentária existente, o principal desafio tem sido o desenvolvimento e a seleção de materiais biocompatíveis e duráveis. Além da biocompatibilidade, o material dentário ideal deve ser ausente de citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade, deve apresentar estabilidade química ou biológica, resistência mecânica, elasticidade e coeficiente de expansão térmica adequados. Essas características dariam a esses materiais a possibilidade de serem os mais semelhantes possíveis ao tecido que será substituído, devolvendo-lhe sua função (ROSLINDO et al., 1997; ANUSAVICE, 2005).

1.1 Biodentine™

Na Endodontia, o desenvolvimento constante de novos materiais buscando biocompatibilidade, ação bactericida, indução de reparação e que proporcionem um selamento adequado, visa que os procedimentos endodônticos tenham uma maior longevidade (CAMARGO, 2008).

Idealmente, os materiais endodônticos devem possuir propriedades físico-químicas satisfatórias e apresentar boa tolerância ao tecido dentário e estruturas adjacentes. Entretanto, o sucesso clínico dos materiais não depende apenas de suas propriedades físico-químicas, mas também de a segurança biológica (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006).

O Biodentine™ é um novo material indicado para diversas situações clínicas na Endodontia. É um cimento de silicato de cálcio (Ca_3SiO_5) que foi desenvolvido com base no cimento de Portland, mas com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade apresentadas por este e seus derivados (DAMMASCHKE, 2012).

Este material pode ser usado para o selamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar direto e indireto, rizogênese incompleta, forramento

de restaurações de amalgama e resina e tipo sanduiche com resina (KOUBI; ELMERINI; KOUBI, 2012).

É um material hidrofílico, ou seja, toma presa em contato com a água, resultando essa interação em partículas de silicato de cálcio gel e hidróxido de cálcio. Apresenta tempo de presa curto (entre 9 e 12 minutos), baixa porosidade, resistência à compressão e flexural (em comparação ao ProRoot® MTA) e boa radiopacidade (DAMMASCHKE, 2012).

Apesar de ser um material promissor, ainda há poucos trabalhos avaliando as características deste material, em especial sua genotoxicidade e mutagenicidade.

1.2 A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana

Mutagenicidade é definida como mudança ou alteração gênica ou inibição ou dano do mecanismo de reparação do DNA, o que resulta em uma célula alterada. Testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Genotoxicidade não é uma medida indicadora de carcinogenicidade, seus estudos consistem na ação dos efeitos adversos físicos e químicos junto ao material genético das células (DNA ou cromossomos) e suas subseqüentes expressões de tais alterações (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Carcinogenicidade é a propriedade que tem uma substância de provocar alterações responsáveis pela indução do câncer. Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pela qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida da carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento principal ou intermediário de tumorigênese (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

A mutagênese ambiental (genética toxicológica) avalia os efeitos genotóxicos em potencial, pois são considerados pré-requisitos importantes para o

desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO SALVADORI; MARQUES, 2003).

As causas do câncer são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, inter-relacionadas. As causas exógenas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas endógenas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas a capacidade do organismo de se defender das agressões externas (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais, alguns deles são bem conhecidos como cigarro e câncer de pulmão, exposição excessiva ao sol e câncer de pele, outros estão sendo avaliados como alguns componentes alimentares e outros ainda são completamente desconhecidos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

1.3 Exposição Humana a Agentes Mutagênicos

É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente ou devido a hábitos e vícios, como elitismo e tabagismo, devido à possibilidade de que a ação mutagênica venha a manifestar-se somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou teratogênese, caracterizando os chamados efeitos cumulativos (MARTINS, 2002).

1.4 Testes para Avaliação de Mutagenicidade e Genotoxicidade

Testes de genotoxicidade dispõem de diversas metodologias que os tornam importantes para pesquisa e avaliação de toxicidade celular podendo identificar potenciais carcinogênicos e mutagenicidade. Os testes atuam em um sistema experimental, divididos em quatro níveis, onde o primeiro nível engloba ensaios moleculares e em bactérias (avaliação de mutação em gene bacteriano); o segundo nível consiste em provas *in vitro* em células de cultivo (avaliação de aberrações cromossômicas); o terceiro nível compreende análises *in vivo* (avaliação de mutações gênicas em células de mamíferos); o quarto e último nível corresponde

aos estudos em populações expostas a materiais genotóxicos (CRUZ; FREITAS, 2010).

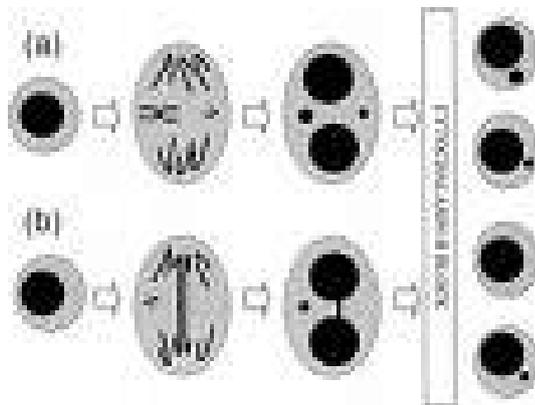
Várias técnicas podem ser utilizadas para testes, tais como: coeficiente DNA/proteína, atividade de enzimas mitocondriais, proliferação celular, quebras e reparo de DNA, índices mitóticos, identificação de danos, aberrações cromossômicas, não disjunções, detecção de apoptose e necrose (CRUZ; FREITAS, 2010). Dentre os principais testes estão:

1. Teste de Ames: este teste fundamenta-se na restauração ou compensação de um defeito genético específico que causa exigência a um determinado nutriente. A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após exposição de uma população a um agente mutagênico. Este teste permite a monitorização da ação direta sobre o material genético e a verificação da atividade positiva e ou negativa de metabólitos após biotransformação, semelhante ao que ocorreria nos fígados dos mamíferos (CRUZ; FREITAS, 2010);

2. Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa”: consiste na quantificação de danos em DNA de células embebidas em gel de agarose, permite a detecção de danos e reparos em uma única célula. Suas vias de reparo de DNA podem ocorrer das seguintes formas: reversão da lesão, reparo por excisão, reparo recombinacional e tolerância a lesões (CRUZ; FREITAS, 2010);

3. Teste do micronúcleo: o micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou seus fragmentos que se atrasam em relação aos demais (Figura A). Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (RAMÍREZ; SALDANHA, 1998; OLIVEIRA, [2010?]).

Figura A – Formação de uma célula micronucleada



(Fonte: RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

1.5 Teste do Micronúcleo

O termo “teste de micronúcleo” foi sugerido pela primeira vez em 1970 por Boller e Schmid e posteriormente por Heddle em 1977 (EVANS, 1997; OLIVEIRA, [2010?]).

O teste do micronúcleo detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; OLIVEIRA, [2010?]).

Nos trabalhos utilizando eritrócitos de ratos, a quantificação do DNA de micronúcleos mostrou que a quantidade correspondia a de cromossomos ou de fragmentos de cromossômicos acêntricos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Atualmente o teste de micronúcleo é ferramenta amplamente utilizada para pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como carcinogênicas, fornecendo resultados com forte suporte estatístico (FENECH et al., 1999).

A facilidade da sua realização leva a ampla adoção mundial como teste de genotoxicidade *in vitro* assim como no monitoramento da população humana (KERN, 2006; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O teste de micronúcleo tem sido usado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente

visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

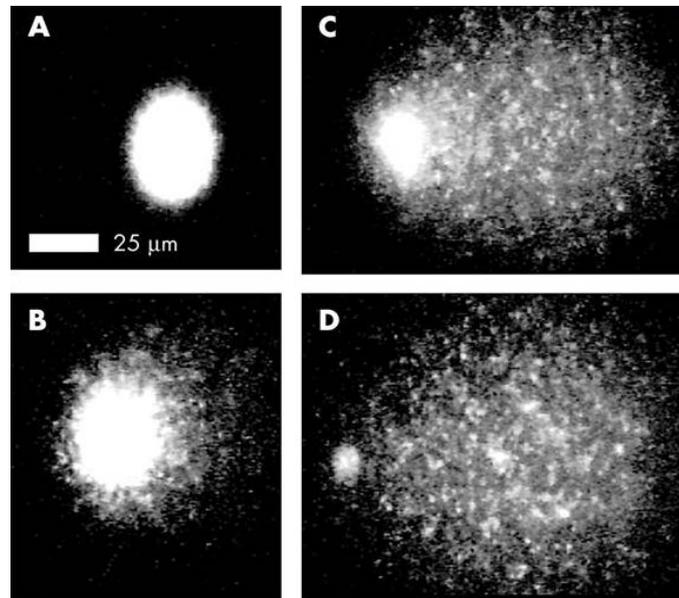
Os testes de micronúcleo podem ser realizados: 1. *in vivo*: onde ocorre a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) e é desenvolvido em eritrócitos de medula óssea (camundongos, ratos); 2. *in vitro*: caracterizado pela identificação de células que completaram uma divisão nuclear, como análise de linfócitos coletados do sangue periférico (VILLELA et al., 2003; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; OLIVEIRA, [2010?]).

O teste de micronúcleo possui como vantagens a análise mais simples quando comparadas a outros testes, serve para diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental, alta sensibilidade e precisão, detecção de perdas cromossômicas e de não-disjunções, medidas de extensão e progressão da divisão nuclear e detecção de eventos de reparo por excisão (VILLELA et al., 2003; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

1.6 Teste do Cometa

O teste do cometa ou gel de eletroforese em célula única (SCGE) foi introduzido pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984 através da técnica microeletroforética para visualização direta dos danos no DNA em células individuais. Nessa técnica observou-se que nas células irradiadas, após a corrente elétrica com pH neutro, partes do DNA foram arrastadas do seu núcleo e fragmentos produzidos por *crosslinks* (ligações cruzadas) e quebras duplas na fita de DNA (DSB) migraram mais, resultando na imagem de um “cometa” (Figura B) (LEFFA, 2008).

Figura B – Teste do Cometa mostrando vários graus de danos ao DNA: A - célula sem dano; B - célula com pequenos danos; C - célula danificada com o clássico “Cometa”; D - célula completamente danificada



(Fonte: LEBAILLY et al., 2003).

É uma técnica valiosa por permitir a detecção de diferenças intercelulares de mutações e reparo de material genético em qualquer célula eucariótica (FREITAS, 2007).

Modificações no protocolo de SCGE facilitam a detecção de quebras em uma fita de DNA e sítios álcali-lábeis, quebras em ambas as fitas do DNA, bem como sítios onde houve reparo incompleto envolvendo excisão das bases. Além disso, é capaz de permitir estudos de diferentes vias de reparo de DNA, tal como por excisão das bases e por excisão de nucleotídeos (KLEINSASSER et al., 2004; HAGIWARA et al., 2006)

A literatura não apresenta trabalhos que a avaliem o potencial genotóxico e mutagênico do Biodentine™, em medula óssea de ratos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade do Biodentine™ por meio dos testes de micronúcleo e Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa”.

REFERÊNCIAS

ANUSAVICE, K. J. **Phillips materiais dentários**: panorama dos materiais para aplicação dentária. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CAMARGO, S. E. A. **Avaliação do comportamento biológico de materiais endodônticos utilizando duas linhagens celulares**. 2008. 15 f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, São José dos Campos.

CRUZ, A. B; FREITAS, R. A. **Toxicologia in vitro**: principais modelos utilizados. Disponível em:
http://www.vsipm.com.br/html/arquivos_menu2/cursos/Curso_7_2.pdf. Acesso em: 05 abr. 2011.

DAMMASCHKE, T. **A new bioactive cement for direct pulp capping**. Disponível em: <http://septodont.com/Flipbooks/casestudies/index.html>. Acesso em:30 ago.2012.

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutation Research**, v. 392, p. 5-10, 1997.

FENECH, M. et al. The human micronucleus project: an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271–83, 1999.

FLORES, M; YAMAGUCHI, U. M. Teste de micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FREITAS, P. S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos SWISS *In vivo***. 2007. 29 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas.

HAGIWARA, M. et al. 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, n. 2, p.111-20, fev. 2006.

KERN, R. **Avaliação de micronúcleos em células epiteliais bucais em estudantes de odontologia**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.

KLEINSASSER, N. H. et al. Genotoxicity and citotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal Dentistry**, v. 32, p. 2229-2234, 2004.

KOUBI, S; ELMERINI, H; KOUBI, G. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations.

International Journal of Dentistry, v. 12, p. 1-6, 2012.

LEBAILLY, P. et al. Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. **Occupational Environment**

Medicine, v. 60, p. 910-917, 2003.

LEFFA, D. D. **Avaliação do potencial genotóxico do rejeito de carvão mineral através do molusco *Helix aspersa***. 2008. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

MARTINS, D. I. **Exposição ocupacional a solventes orgânicos em trabalhadores de laboratórios e efeitos genotóxicos**. 2002. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, R. J. **Genética, toxicológica e meio ambiente: uma abordagem teórico-prática**. [2010?]. Disponível em:

<http://pt.scribd.com/doc/65685258/EcoToxMicronucleo>. Acesso em: 05 abr. 2011.

RAMÍREZ, A; SALDANHA, P. H. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. **Genética Molecular e Biologia**, v. 21, n. 3, p. 140,1998.

RIBEIRO, R. L; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K (Org.). **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ROSLINDO, N. C. et. al. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal e germes dentários *in vitro*. **Revista odontológica UNESP**,v. 26, n. 2, p. 265-274, 1997.

SCHWEIKL, H; SPAGNUOLO, G; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**. v. 85, n. 10. p. 870-877, 2006

VILLELA, I. V, et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; EERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

2 ARTIGO

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIODENTINE™

EVALUATION OF GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY OF BIODENTINE™

Gustavo de Almeida Logar¹, Gisele Alborghetti Nai², Graziela Garrido Mori ³, Ligia Moraes Teixeira⁴, Bruna Camila Ferreira da Silva⁵, Ana Elisa Maranhão de Moraes⁶, Felipe André Cabral⁶.

¹Discente de Mestrado, Mestrado em Ciência Animal, professor da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Doutora, professora do Departamento de Patologia e do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Doutor, professora da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁴Mestre, professora da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁵Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq).

⁶Discente de graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil.

RESUMO

O Biodentine™ é um novo material indicado para diversas situações clínicas na odontologia. Apesar de ser um material promissor, ainda há poucos trabalhos avaliando as características deste material, em especial sua genotoxicidade e mutagenicidade. **Objetivo:** Este estudo visa avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do Biodentine™ *in vivo*. **Material e métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar albinos, machos, distribuídos em 3 grupos: A – 8 ratos onde foram colocados corpos de prova medindo 2mm de diâmetro x 10mm de comprimento de Biodentine™ no subcutâneo do dorso; B – 8 ratos, que receberam ciclofosfamida em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (grupo controle positivo); C – 8 ratos onde foram colocados corpos de prova medindo 2mm de diâmetro x 10mm de comprimento sem Biodentine™ no subcutâneo do dorso (grupo controle negativo). Após 24 horas, todos os animais foram eutanasiados e material da medula óssea dos fêmures de cada rato foi coletado para realização do Teste do Cometa e do Teste do micronúcleo. **Resultados:** O Biodentine™ apresentou níveis de danos no DNA (*tail intensity* %) em células da medula óssea de $23,57 \pm 7,70$, a ciclofosfamida de $27,43 \pm 7,40$ e o controle negativo de $24,75 \pm 5,55$ ($p < 0,05$). A média de micronúcleos no grupo exposto ao Biodentine foi de 6,25 (desvio padrão – DP= 3,53), no grupo exposto a ciclofosfamida foi de 9,75 (DP= 2,49) e no grupo de controle negativo foi 0,75 (DP= 1,03) ($p < 0,0001$). **Conclusão:** O Biodentine™ apresentou aumento na frequência de micronúcleos, mas não apresentou efeito genotóxico observado pelo teste do Cometa.

Palavras-chave: cimento de silicato, genotoxicidade, mutagenicidade, materiais dentários, endodontia.

ABSTRACT

The Biodentine™ is a new material suitable for various clinical situations in dentistry. Despite being a promising material, there are few studies evaluating the characteristics of this material, especially its genotoxicity and mutagenicity.

Objective: This study aims to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of Biodentine™ *in vivo*. **Methods:** We used 24 Wistar albino rats, males were divided into 3 groups: A - 8 rats where specimens of Biodentine™ measuring 2 mm in diameter x 10mm length on the dorsum were placed, B - 8 rats, which received cyclophosphamide in single C - 8 rats where specimens measuring 2 mm in diameter x 10mm long without Biodentine™ on the dorsum were placed (negative control group). After 24 hours, all animals were euthanized and material from bone marrow of femurs was collected to perform the Comet assay and micronucleus test. **Results:** Biodentine™ showed levels of DNA damage (tail intensity %) in bone marrow cells of 23.57 ± 7.70 , cyclophosphamide of $27,43 \pm 7,40$ and negative control of $24.75 \pm 5 55$ ($p < 0.05$). The average number of micronuclei in the exposed Biodentine™ group was 6.25 (standard deviation - SD = 3.53), in the group exposed to cyclophosphamide was 9.75 (SD = 2.49) and negative control group was 0.75 (SD = 1.03) ($p < 0.0001$). **Conclusion:** The Biodentine™ showed an increase in the frequency of micronuclei, but no genotoxicity effect by the Comet assay.

Key words: silicate cement, genotoxicity, mutagenicity, dental materials, endodontics.

INTRODUÇÃO

O Biodentine™ é um novo material indicado para diversas situações clínicas na Endodontia. É um cimento de silicato de cálcio (Ca_3SiO_5) que foi desenvolvido com base no cimento de Portland, mas com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade apresentadas por este e seus derivados¹. É constituído por pó e líquido que são misturados para a formação do cimento. O pó é composto por silicato tricálcio, carbonato de cálcio e óxido de zircônio como radiopacificador, enquanto o líquido contém cloreto de cálcio e um polímero hidrossolúvel². Pode ser usado para o selamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar direto e indireto, rizogênese incompleta, forramento de restaurações de amalgama e resina e tipo sanduiche com resina¹.

Além da biocompatibilidade, o material dentário ideal deve ser ausente de citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade, deve apresentar estabilidade química ou biológica, resistência mecânica, elasticidade e coeficiente de expansão térmica adequados. Essas características dariam a esses materiais a possibilidade de serem os mais semelhantes possíveis ao tecido que será substituído, devolvendo-lhe sua função³. Assim, o sucesso clínico dos materiais não depende apenas de suas propriedades físico-químicas, mas também de a segurança biológica⁴.

Os principais testes de genotoxicidade e mutagenicidade utilizados são o Teste de Ames, a Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa” e o Teste do micronúcleo⁵.

O “teste do cometa” ou gel de eletroforese em célula única (SCGE) foi introduzido pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984, através da técnica microeletroforética para visualização direta dos danos no DNA em células individuais. É uma técnica valiosa por permitir a detecção de diferenças intercelulares de mutações e reparo de material genético em qualquer célula eucariótica^{6,7}.

O teste de micronúcleo é ferramenta amplamente utilizada para pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como mutagênicas, fornecendo resultados com forte suporte estatístico⁸. A facilidade da sua realização leva a ampla adoção mundial como teste genotoxicidade assim como no monitoramento da população humana⁸. Este teste detecta agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e/ou aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal)⁹.

A literatura não apresenta trabalhos que a avaliem o potencial genotóxico e mutagênico do Biodentine™ *in vivo*, portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade do Biodentine™ por meio dos testes de micronúcleo e eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa” *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 1450) (Anexo 1).

Protocolo animal

Para este estudo, foram utilizados 24 ratos Wistar albinos, com 8 semanas, machos, com peso entre 170 a 210 gramas. Os ratos foram mantidos em caixas individuais e colocados em biotério climatizado com umidade, temperatura e fotoperíodo de 12 horas controlados. Animais de todos os grupos receberam ração sólida (SUPRALAB Comércio e Serviço Ltda, São Leopoldo, Brasil), com exceção das primeiras doze horas pré-operatórias, e água à vontade.

Para a realização das intervenções cirúrgicas, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de ketamina (Dopalen – Sespo Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (Anasedan – Agribrands do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) por via intramuscular, na dosagem de 0,05ml/100g de peso animal para cada substância citada¹⁰. Após isso, os animais foram distribuídos em 3 grupos: Grupo A - experimental (n=8): nesse grupo foi testado o Biodentine™ (Septodont, Bruxelas, Bélgica). Os corpos de prova de Biodentine™ foram confeccionados com o auxílio de matriz de polietileno esterilizada medindo 2mm de diâmetro interno e 10mm de comprimento. Após a espatulação do Biodentine™, seguindo as recomendações do fabricante, a matriz foi preenchida com o mesmo. Após a presa inicial do material, o corpo de prova de Biodentine™ foi introduzido no dorso animal¹⁰. Para isso, os animais tiveram seus dorsos tricotomizados e a anti-sepsia da área, realizada com clorexidina 0,12% (Periogard, Pfizer Ltda, São Paulo, Brasil). Na sequência, cada animal recebeu uma incisão na região mediana do dorso com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Embramac Exportação e Importação, São Paulo, Brasil). Lateralmente à incisão, o tecido cutâneo foi pinçado e divulsionado com uma tesoura de ponta romba. As incisões foram suturadas com fio de nylon 5-0 (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil); Grupo B – controle

positivo (n= 8): os quais receberam ciclofosfamida (Genuxal, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento⁹; e Grupo C – controle negativo (n=8): os animais sofreram o mesmo procedimento dos animais do grupo A, porém foi introduzido um corpo de prova medindo 2mm de diâmetro x 10mm de altura vazio e estéril, sem Biodentine™¹⁰. A ciclofosfamida foi usada como controle positivo, pois na concentração de 50 ml/kg, esta droga causa formação de micronúcleos⁹.

Todos os animais foram eutanasiados 24 horas após o início do experimento⁹. A eutanásia foi realizada em câmara de gás com inalação de CO₂ (Indústria Beiramar, São Paulo, Brasil). Os indicativos de morte foram: ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos¹¹.

Os dois fêmures dos animais foram retirados logo após o óbito dos mesmos e imediatamente seccionados nas duas extremidades para coleta da medula óssea. Após a secção das extremidades, foi realizada a injeção de soro fisiológico (1ml) com auxílio de uma agulha em uma das extremidades, para que o material seja expelido através da outra.

Teste do cometa

Foi coletado material da medula óssea do fêmur direito de cada rato no momento da eutanásia. A quantidade de células por mL foi calculada aplicando-se 10 µL da solução de células da medula óssea em câmara de Neubauer, utilizando-se a fórmula $C = [(n/5) \times 25] / 10^{-4}$ (C= células/mL; n = média da soma das diagonais de parte de cima e de baixo da câmara de Neubauer; 5 = nº de quadrados da diagonal e 25 = nº total de quadrados).

Para análise de viabilidade, foram misturados 10 μ L da solução de células da medula óssea com 10 μ L de azul de tripano (Thermo Scientific, South Loga, Utah – USA) e analisadas 200 células por tratamento. Verificou-se a viabilidade mínima de 81%. Devido a viabilidade mínima recomendada para o Ensaio Cometa ser de 75%, não houve necessidade de descartar nenhuma amostra¹².

O Ensaio Cometa foi conduzido conforme metodologia descrita por Singh et al¹². Para verificação do nível de danos no DNA, foi utilizada a versão alcalina (pH > 13), a qual detecta quebras de fita simples, quebras de fita dupla e sítios lábeis alcalinos (quebras de fitas – QFs).

Foram embebidos 10 μ L (\approx 10000 células) da suspensão de células da medula óssea em 120 μ L de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) de baixo ponto de fusão a 0,5% e difundidos sobre uma lâmina de microscópio recoberta com agarose normal a 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), as lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira para solidificação da agarose. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas, por uma noite, em solução de lise [2,5 M NaCl, 100 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), 10mM Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), 1% de sal sódio, N-lauril sarcosinato pH 10 (Sigma-Aldrich Co. LLC. - EUA), com 1% de Triton X-100 (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, USA) e 10% de DMSO (Malinckrodt, Phillisburg, NJ, USA)] a 4°C. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ por 5 minutos, para homogeneização da agarose. Posteriormente, as células foram expostas a tampão alcalino [1mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) e 300 mM NaOH, pH \cong 13,4 (Merck, USA)], a 4°C, por 40 minutos, para permitir a expressão das quebras de fita simples e dos sítios lábeis alcalinos (“alkali unwinding”). A eletroforese foi conduzida, na mesma solução, a 4°C, por 30 min, a 25 V e 300 mA. Após a

eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4M Tris-HCl, pH 7,5) a intervalos de 5 minutos por 3 vezes, fixadas em etanol absoluto e armazenadas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 μ L de syber green (1:10000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay IV – Perceptive Instruments, USA). Foram analisadas por amostra 2 lâminas, em aumento de 400x, 100 células (50 nucleóides por lâmina), totalizando 2400 nucleóides analisados. O parâmetro utilizado para avaliação de danos no DNA foi a média do “*tail intensity*”. Segundo o fabricante (Perceptive Instruments, USA) o “*tail intensity* é definido como a % de DNA na cauda do cometa. Este parâmetro reflete o nível de danos no DNA da cauda em cada célula. Dos 9 parâmetros fornecidos pelo software este parâmetro é o recomendado pelas diretrizes internacionais”.

Como controle positivo de cada corrida de eletroforese foram utilizados linfócitos isolados de voluntário saudável, tratados com 100 μ M de peróxido de hidrogênio por 30 minutos, com prévio conhecimento dos níveis de danos no DNA.

Teste do micronúcleo

Foi coletado material da medula óssea do fêmur esquerdo de cada rato no momento da eutanásia e foram realizadas duas lâminas por animal⁹. As lâminas foram coradas pelo corante de Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil). Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromáticos por animal (1000 em cada lâmina) utilizando-se microscópio óptico, no aumento de 400x⁹. Micronúcleos foram considerados como uma estrutura com a membrana circundante, menores de um terço do diâmetro do núcleo associado, semelhante na intensidade de coloração e microscopia no mesmo plano focal do

núcleo associado¹³. A análise das lâminas foi cega e realizada por um avaliador (GAL) e revisada por outro observador (GAN), que concordou com os resultados (Kaplan=0,9).

Análise estatística

Para o teste do cometa foi realizada a análise estatística com o teste de variância a um critério (*on-way* ANOVA). A variável frequência de micronúcleos foi avaliada pelo Teste de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software SPSS 12.0, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Teste do Cometa

A Tabela 1 apresenta os níveis de danos no DNA (*tail intensity*), quantificados pelo ensaio cometa, em células da medula óssea, tratadas com Biodentine™. As amostras dos grupos controle negativo e grupo tratado com Biodentine™ apresentaram menores níveis de danos no DNA ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo tratado com ciclofosfamida (controle positivo). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa dos níveis de danos no DNA do grupo controle negativo quando comparado ao grupo tratado com Biodentine™ ($p > 0,05$) (Figura 1).

Tabela 1 - Níveis de danos no DNA (*tail intensity* %) em células da medula óssea, tratadas com Biodentine™, ciclofosfamida e sem tratamento (controle negativo) avaliados pelo teste do cometa.

Grupos	Nível de danos no DNA (Tail intensity %) – QFs*
Biodentine™	23,57 ± 7,70 ^b
Ciclofosfamida [#]	27,43 ± 7,40 ^a
Controle negativo	24,75 ± 5,55 ^b

*QFs: quebras de fitas. [#]Ciclofosfamida: controle positivo. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0.05$).

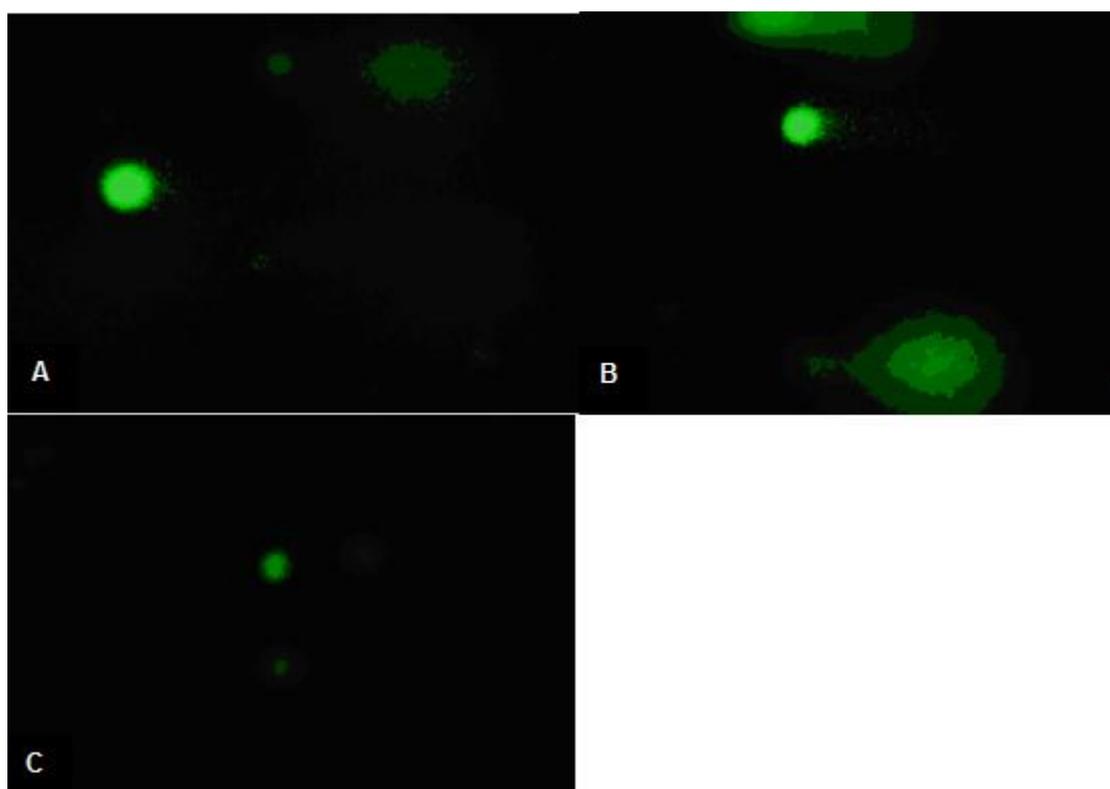


Figura 1 - Teste do cometa mostrando os níveis de danos nas células da medula óssea: A - QFs das células tratadas com Biodentine™; B - QFs das células tratadas com Ciclofosfamida (controle positivo); C - QFs das células do controle negativo.

*QFs: quebras de fitas.

Teste do micronúcleo

Houve aumento na frequência de micronúcleos no grupo exposto ao Biodentine™ em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Tabela 2). Houve diferença entre o número de micronúcleos em relação ao grupo controle positivo (ciclofosfamida) e o grupo exposto ao Biodentine™ e o grupo controle negativo ($p < 0,0001$) (Figura 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão da contagem de micronúcleos por grupo estudado.

Grupo	Média	Desvio padrão
Biodentine™	6,25 ^b	3,53
Ciclofosfamida [#]	9,75 ^a	2,49
Controle negativo	0,75 ^c	1,03

[#]Ciclofosfamida: controle positivo. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0,05$).

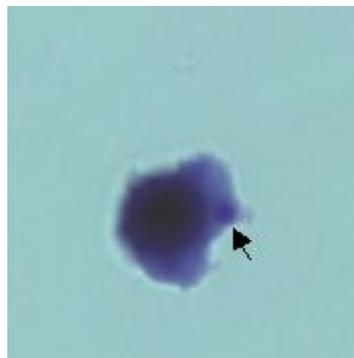


Figura 2 – Eritrócito policromático com micronúcleo (seta) – animal exposto ao Biodentine™ (Coloração de Giemsa, aumento de 1000x).

DISCUSSÃO

Alguns estudos têm mostrado que o Biodentine™ aplicado diretamente sobre a polpa induz a síntese de dentina reparadora, provavelmente devido a uma modulação de células da polpa secreção de TGF-beta1¹⁴, sendo um bom substituto para dentina em restaurações^{4,15} e mais resistente à força de cisalhamento¹⁶.

O estudo de Laurent et al¹⁷ avaliou genotoxicidade, citotoxicidade e efeitos do Biodentine™ sobre as funções específicas nas células-alvo, o qual mostrou que a porcentagem de mortalidade de células com este cimento foi semelhante ao de outros materiais biocompatíveis, além deste não afetar funções específicas nas células-alvo, como mineralização, expressão de colágeno I, dentina e sialoproteína. No estudo destes autores realizado *in vitro* em linfócitos e fibroblastos da polpa de humanos, o Teste de Ames não mostrou qualquer sinal de mutagenicidade deste novo material, bem como, a incidência de linfócitos com micronúcleos e a porcentagem de DNA na cauda no ensaio cometa foram semelhantes aos do controle negativo. No presente estudo, obteve-se resultado semelhante em relação ao teste do cometa. Em relação, ao teste do micronúcleo, embora o Biodentine™ tenha apresentado menor número de micronúcleos que o grupo exposto a ciclofosfamida (controle positivo), este apresentou maior frequência de micronúcleos que o grupo controle negativo, mostrando que este produto tem potencial mutagênico. Essa maior frequência de micronúcleos difere do encontrado em Laurent et al¹⁷, por não ter sido diluído o Biodentine™, pois a proposta do presente trabalho foi simular o uso no produto seguindo as recomendações do fabricante para aplicação clínica no sitio alvo em seres humanos, que é o dente. No estudo de Laurent et al¹⁷ somente o teste do cometa utilizou amostra não diluída e a mesma não apresentou efeito genotóxico, no entanto, no teste do micronúcleo foram

analisadas maiores diluições das encontradas no teste do cometa e não foi especificado o motivo de não se comparar as mesmas diluições nos dois testes inclusive a não diluída.

Outra diferença entre este e o estudo de Laurent et al¹⁷, é que o segundo realizou avaliação *in vitro* (com linfócitos humanos) do Biodentine™ e este realizou a avaliação *in vivo* (com células da medula óssea de ratos). O teste *in vivo* é importante para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de um produto e pode apresentar resultados positivos para mutagenicidade que em alguns casos não é possível ser observado em testes *in vitro*. As razões destas diferenças variam de composto para composto e incluem diferenças metabólicas, a influência da flora intestinal, exposições mais elevadas em comparação *in vivo* com *in vitro* e os efeitos sobre a farmacodinâmica. Quando o produto é testado pela primeira vez e não se conhece sua genotoxicidade, é interessante que se complemente o teste *in vitro* com o *in vivo*^{18,19}.

Outro cimento de composição e formulação semelhantes ao Biodentine™, o MTA (trióxido mineral agregado), também foi avaliado em relação a sua mutagenicidade e genotoxicidade, sendo observado formação de micronúcleos pelo cimento MTA semelhante a do grupo controle negativo²⁰, assim como ausência de genotoxicidade para este por meio do teste do cometa²¹. A diferença de composição do cimento MTA e o Biodentine™ está em alguns elementos químicos no pó e ao invés de um líquido de formulação química específica, o MTA necessita de água destilada para seu endurecimento. Essa diferença de composição química dos cimentos sugere que a presença de um aumento da frequência de micronúcleo do Biodentine™, verificada no presente estudo, pode estar relacionada a algum composto químico do pó e/ou do líquido que não está presente no MTA. O estudo de

Kaplan et al²² mostrou que o policarboxilato (Aqualox[®]) apresenta efeito mutagênico no ensaio com *S. typhimurium* TA 98 e TA 1535, sendo que na presença de fração S9, este produto provocou efeitos mutagênicos fracos em *S. typhimurium* TA 1535 e efeitos mutagênicos dose-dependentes em *S. typhimurium* TA 98. Este dado corrobora a hipótese que o aumento da frequência de micronúcleos observada na exposição ao Biodentine™ possa estar relacionada a compostos presentes no líquido, como o policarboxilato, ou no pó.

O presente estudo sugere que o líquido e/ou o pó do Biodentine™ apresenta efeito mutagênico aneugênico e não clastogênico, pois o teste do cometa, que apresentou resultado negativo para genotoxicidade do Biodentine™, detecta quebra de fitas simples. A quebra de fita dupla de DNA é observada apenas em substâncias mutagênicas clastogênicas, o que detectado pelo teste do micronúcleo²³.

Porém, mais estudos *in vivo* com exposição a diferentes doses do Biodentine™, bem como exposição somente ao pó e somente ao líquido de sua composição, são necessários para que se possa estabelecer de forma definitiva se este possui potencial mutagênico e/ou genotóxico.

CONCLUSÃO

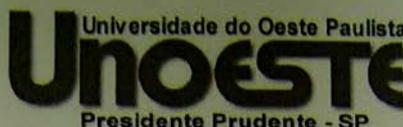
O Biodentine™ apresentou efeito mutagênico pelo teste do micronúcleo, mas não apresentou efeito genotóxico observado pelo teste do Cometa, no estudo *in vivo* em células da medula óssea de ratos.

REFERÊNCIAS

1. Koubi S, Elmerini H, Koubi G, Tassery H, Camps J. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent*. 2012;12:1-6.
2. Han L, Okiji J. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *International Endodontic Journal*, 2011; 44, 1081-7. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01924.x
3. Roslindo NC, Roslindo EB, Hetem S, Da Mata AC, Malagoli DM. Biocompatibility of vegetable polyurethane resin and tooth germs in vitro. *Rev Odontol UNESP* 1997; 26(2): 265-74.
4. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006; 85(10):870-7.
5. Flores M, Yamaguchi UM. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. *Rev Saude Pesq* 2008; 1(3):337-40.
6. Kleinsasser NH, Wallner BC, Hárreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX. Genotoxicity and citotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 2004; 32:2229-34.
7. Hagiwara M, Watanabe E, Barrett JC, Tsutsui T. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res*. 2006;603(2):111-20.
8. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 1999; 428:271–83.

9. Mac Gregor JT. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987; 189(2):103-12.
10. Mori GG, Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR. Biocompatibility of Acetazolamide Pastes in the Subcutaneous Tissue of Rats. *Braz Dent J* 2009; 20(1): 17-21.
11. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso em 22 ago 2012.
12. Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-91.
13. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*.1992; 271:69-77.
14. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012;45(5):439-48. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01995.x.
15. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, Lambert G. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):243-9. doi: 10.1007/s00784-012-0701-9.
16. Odabaş ME, Bani M, Tirali RE. Shear bond strengths of different adhesive systems to biodentine. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013:626103. doi: 10.1155/2013/626103.
17. Laurent P, Camps J, De M'eo M, D'ejou J, About I. Induction of specific cell

- responses to a Ca₃SiO₅-based posterior restorative material. *Dental Materials* 2008; 24:1486-94.
18. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res.* 2003;540(2):153-63.
19. Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, Nohmi T, O`Donovan MR, Sasaki YF, Sofuni T, Tice R. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res.* 2007; 627(1): 92–105.
20. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CHR. Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Sealers Based on Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2012; 38(4): 495-500.
21. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:258-61
22. Kaplan C, Diril N, Sahin S, Cehreli MC. Mutagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test. *Biomaterials.* 2004;25(18):4019-27.
23. Mateuca R, et. al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88:1515-31.

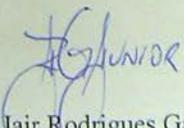
ANEXOS**Anexo 1 - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).**

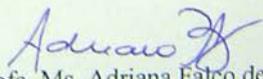
Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIODENTINE”** cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº **1450** tendo como pesquisador responsável a Profa. **GISELE ALBORGHETTI NAI**, as docentes participantes **GRAZIELA GARRIDO MORI PANUCCI** e **LIGIA MORAES TEIXEIRA**, e os acadêmicos **ANA ELISA MARANHO DE MORAES**, **BRUNA CAMILA FERREIRA DA SILVA**, **FELIPE ANDRÉ CABRAL** e **GUSTAVO DE ALMEIDA LOGAR** foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP.

Presidente Prudente, 16 de outubro de 2012.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Profa. Ms. Adriana Fátco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

Anexo 2 – Normas de publicação da revista científica a qual o artigo será submetido.



Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

[General Points on Composition](#)

[Organization of Original Research Manuscripts](#)

[Manuscripts Category Classifications and Requirements](#)

[Available Resources](#)

1. General Points on Composition

1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive

verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”
8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.
9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.
2. **Organization of Original Research Manuscripts**

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., *Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc.*, and should not exceed more than 250 words in length.

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by

electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.

2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol *or* specify any changes made to the protocol. If the study used an ***in vitro* model** to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies

involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).
6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, "A," "B," etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (*J Endod* 2012;38:884–888); Olivieri et al., (*J Endod* 2012;38:1007–1011); Tsai et al (*J Endod* 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures).

The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

8. Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).
9. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
10. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
11. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

3. Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

1. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at www.consort-statement.org/. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
2. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by extensive review of the literature will should be categorized as "Case Report/Clinical Technique". These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
3. Clinical Research (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.
6. Case Report/Clinical Technique (e.g., report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the *JOE* Editor or associate editors. If you are not sure whether

your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu.

Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available

Resources:

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.

Day R. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.

Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar).

Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.

Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

- See more at: <http://www.aae.org/publications-and-research/journal-of-endodontics/authors-and-reviewers/guidelines-for-publishing-papers-in-the-joe.aspx#sthash.T1VmmAo6.dpuf>